

Technische Universität München

Frauenklinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar

Gynäkologische Tumorgenetik

**Analyse von DPYD-Polymorphismen
zur Abklärung 5-FU-bedingter
Nebenwirkungen**

Veronika Elisabeth Wessinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Alfons Meindl
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 29.02.2016 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 12.04.2017 angenommen.

Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
2. 5-Fluorouracil und die Dihydropyrimidindehydrogenase	12
2.1 Charakteristiken einer Chemotherapie mit 5-FU	12
2.1.1 Wirkmechanismus	12
2.1.2 Abbau durch die Dihydropyrimidindehydrogenase	13
2.1.3 Pharmakokinetik.....	15
2.1.4 Orale Therapie mit Capecitabine.....	17
2.1.5 Nebenwirkungen	19
2.1.6 Wechselwirkungen	20
2.1.7 Kombination mit anderen Substanzen.....	20
2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen von 5-Fluorouracil.....	22
2.1.9 5-FU- bzw. Capecitabine-haltige Chemoschemata	23
2.2 Problematik einer 5-FU-haltigen Chemotherapie	24
2.2.1 Komplette und partielle Defizienz der DPD	24
2.2.2 Genetische Ursachen der DPD-Defizienz	27
3. Zielsetzung der Arbeit	32
4. Material und Methodik	34
4.1 Chemikalien	34
4.2 Kits und Bioreagenzien	34
4.3 Gebrauchswaren	35
4.4 Technische Geräte	36
4.5 Lösungen, Puffer und Medien.....	37
4.6 Primer	37
4.7 EDV-Software	38
4.8 Isolierung genomischer DNA	39
4.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....	40
4.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
4.11 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC).....	44
4.12 Gelelektrophorese	50
4.13 Aufreinigen des PCR-Produktes	51
4.14 Cycle-Sequencing Reaktion.....	51
4.15 RNA-Isolierung aus Vollblut	53
4.16 Amplifikation von mRNA durch RT-PCR.....	54
4.17 Statistische Auswertung.....	56
5. Ergebnisse	57
5.1 Rekrutierung des Patientenkollektivs	57
5.2 Unterteilung des Patientenkollektivs	59
5.3 Eigenschaften des Patientenkollektivs.....	62
5.4 Spleißmutation IVS12-1G>A.....	66
5.4.1 Patientencharakteristik	66
5.4.2 Analyse mittels DHPLC	67
5.4.3 Sequenzanalyse der genomischen DNA.....	67
5.4.4 Analysen der cDNA.....	68
5.4.5 <i>Follow up</i> des Patienten	71
5.5 Ergebnisse zu den SNPs c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A im DPYD-Gen.....	72
5.5.1 DHPLC-Analysen von c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A.....	72

5.5.2 Genotyphäufigkeiten von c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A in den verschiedenen Kollektiven.....	74
5.5.3 Kopplung von c.496A>G und IVS10-15T>C.....	75
5.5.4 Korrelation zwischen c.496A>G bzw. IVS10-15T>C und 5-FU-assozierten Nebenwirkungen	76
5.5.5 Korrelation zwischen c.1236G>A und 5-FU-assozierten Nebenwirkungen	77
5.6 c.1129-5923C>G in Intron 10	78
5.7 Unbekannte SNPs IVS10-114G>A und IVS10-96A>G	79
5.8 Nebenwirkungen und Applikationstyp	81
5.9 Nebenwirkungen und Alter bzw. Geschlecht	84
6. Diskussion	86
6.1 Bedeutung c.496A>G und IVS10-15T>C.....	86
6.2 Bedeutung von c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G	92
6.3 Bedeutung der bisher unbekanntenen Mutationen IVS12-1G>A, IVS10-114G>A und IVS10-96A>G	96
6.4 Risikofaktoren Alter, Geschlecht und Applikationsweise.....	97
7. Zusammenfassung	99
Literaturverzeichnis	105
Danksagung	118
Anhang	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von 5-Fluorouracil	12
Abbildung 2: Stoffwechselweg von (Fluoro)pyrimidinen	12
Abbildung 3: Reaktionskaskade des Pyrimidinkatabolismus	13
Abbildung 4: Wirkmechanismus von 5-Fluorouracil auf die Thymidylatsynthase	13
Abbildung 5: Der katabole Stoffwechselweg von 5-FU	14
Abbildung 6: Gesamtstruktur einer Schweine- DPD	14
Abbildung 7: Verteilung der DPD-Aktivitäten in gesunden Afroamerikanern (n = 149; schraffiert) und Kaukasiern (n = 109; weiß)	16
Abbildung 8: Die Aktivität der DPD in mononukleären Zellen des peripheren Blutes folgt der Normalverteilung	16
Abbildung 9: (A) Die zirkadiane Rhythmik der DPD in Rattenleber unter normalen Tagesbedingungen und (B) unter umgedrehten Lichtverhältnissen (mit Licht zwischen 18 Uhr und 6 Uhr)	17
Abbildung 10: Stoffwechselweg von Capecitabine (nach: Miwa, Ura et al., 1998)	17
Abbildung 11: 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben in der XELOXA-Studie	18
Abbildung 12: Die DPD-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (A) in der Kontrollgruppe und (B) in heterozygoten Trägern einer Mutation im DPD-Gen	29
Abbildung 13: Messungsbeispiel einer DNA-Stammlösung am Nanodrop®	41
Abbildung 14: Absorptionskurven doppel- und einzelsträngiger DNA	42
Abbildung 15: Retentionsmechanismus bei der Auftrennung von Doppelstrang-DNA mittels RP-IP HPLC	44
Abbildung 16: Interaktion zwischen TEAA und DNA-Molekülen	45
Abbildung 17: Unterschiedliche Elutionsgeschwindigkeit zwischen DNA-Fragmenten verschiedener Länge	46
Abbildung 18: Heteroduplexbildung durch Hybridisierung	47
Abbildung 19: Der Effekt von unterschiedlichen Temperaturen auf die Differenzierung von Homo- und Heteroduplexen	48
Abbildung 20: Teilweise denaturierende Detektion mit dem WAVE® System von SNPs in einem 185bp Fragment	49
Abbildung 21: Strukturvergleich eines 2',3'-Didesoxynukleotids und eines 2'-Desoxynukleotids	51
Abbildung 22: Die Dye Terminator Cycle-Sequencing Reaktion	52
Abbildung 23: Übersicht zur Sequenzierreaktion	52
Abbildung 24: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung mit dem PAXgene™ Blood RNA Kit und Tube	53
Abbildung 25: Verteilung des Patientenkollektivs auf die Tumorgruppen	59
Abbildung 26: Verteilung auf die Tumorsubtypen in der Gruppe mit Mammakarzinom	59
Abbildung 27: Verteilung auf die Tumorsubtypen in der Gruppe mit malignen gastrointestinalen Tumoren	60
Abbildung 28: Patientenverteilung in nebenwirkungsarme vs. nebenwirkungsreiche Gruppe	60
Abbildung 29: Tumorentitäten in den beiden Patientengruppen „leichte/keine Toxizität“ und „Toxizität °III – °IV	61

Abbildung 30: Vergleich der DHPLC-Profile des Exon 13 der Wildtypkontrolle (B) und einer unbekanntem heterozygoten Mutation (A).....	67
Abbildung 31: Sequenzausschnitt von Patient 42 um IVS12-1G>A im Exon 13	68
Abbildung 32: Primerauswahl für die cDNA.....	69
Abbildung 33: Gelbild der cDNA-Ansätze von Patient 42 mit <i>Random</i> Primern und den spezifischen Primern 5 for und 6 rev	69
Abbildung 34: Schematische Darstellung des <i>in vivo</i> ablaufenden Spleißvorgangs	70
Abbildung 35: Die beiden aus der Punktmutation IVS12-1G>A resultierenden Varianten der mRNA im Vergleich.....	71
Abbildung 36: Vergleich der DHPLC-Profile für IVS5-8C>T (A) und c.496A>G (B)	72
Abbildung 37: Vergleich der DHPLC-Profile für IVS10-15T>C (A) und IVS10-28G>T (B)	73
Abbildung 38: Vergleich der DHPLC-Profile für c.1236G>A (A) und c.1218G>A (B)	73
Abbildung 39: Vergleich der DHPLC-Profile des Intron 10 zwischen Wildtypkontrolle (B) und c.1129-5923C>G (A)	79
Abbildung 40: DHPLC-Profile der unbekanntem SNPs IVS10-114G>A (A) und IVS10-96A>G (B)	80
Abbildung 41: Sequenzanalysen der unbekanntem SNPs IVS10-114G>A (A) und IVS10-96A>G (B)	80
Abbildung 42: Vorkommen der DPYD-Varianten c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G im Patientenkollektiv in Hinblick auf Toxizitätserscheinungen unter 5-FU-haltiger Chemotherapie	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Protokoll für Exon 4 und Exon 6.....	43
Tabelle 2: PCR-Protokoll für Exon 2, 10, 11, 13, 14, 22.....	43
Tabelle 3: Temperaturprofil für die PCR-Reaktion.....	43
Tabelle 4: Temperaturprofil des Touchdown-Programms für Intron 10	44
Tabelle 5: Temperaturprofil des HET-Programms für die Hybridisierungsreaktion	49
Tabelle 6: Temperaturprofil für die Cycle-Sequencing-Reaktion	52
Tabelle 7: Pipettierschema für die Reverse Transkription	55
Tabelle 8: Temperaturprofil für die Reverse Transkription	55
Tabelle 9: Pipettierschema für die der Reversen Trankription folgenden PCR.	55
Tabelle 10: Temperaturprofil für die der Reversen Transkription folgenden PCR	55
Tabelle 11: Bezeichnungszuordnung für die Berechnung der T-Statistik	56
Tabelle 12: Die Eigenschaften „Geschlecht, Alter und Tumortyp“ im Patientenkollektiv	62
Tabelle 13: Die Eigenschaft „Chemotherapieschema“ im Patientenkollektiv....	63
Tabelle 14: Patientencharakteristik und Ergebnisse der SNP-Analysen für die restlichen 38 Patienten/-innen aus der Toxizitätsgruppe mit nicht näher spezifizierten Nebenwirkungen °III - °IV	64
Tabelle 15: Patientencharakteristik und Ergebnisse der SNP-Analysen der 52 Patienten/ -innen mit genau dokumentierten Nebenwirkungen	65
Tabelle 16: Vergleich der Häufigkeiten von c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A im Patientenkollektiv „Mammakarzinom“ bzw. „maligne GI- Tumoren“ im Vergleich zur Kontrollgruppe	75
Tabelle 17: Kreuztabelle zum Kopplungsverhalten zwischen c.496A>G und IVS10-15T>C im gesamten Patientenkollektiv	75
Tabelle 18: Korrelation zwischen c.496A>G bzw. IVS10-15T>C und 5-FU- assoziierten Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv, sowie den Untergruppen „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“.....	76
Tabelle 19: Korrelation zwischen c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv, sowie den Untergruppen „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“	78
Tabelle 20: Kreuztabelle zwischen IVS10-114G>A und Kontrolle bzw. Tumorart	81
Tabelle 21: Kreuztabelle zwischen Applikationstyp der 5-FU-haltigen Chemotherapie und aufgetretenen Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv	82
Tabelle 22: Kreuztabelle zwischen dem Applikationstyp der 5-FU-haltigen Chemotherapie und der aufgetretenen Hämatotoxizität	82
Tabelle 23: Korrelation zwischen c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen aufgegliedert nach Applikationsweise	83
Tabelle 24: Korrelation zwischen Alter bzw. Geschlecht und Art der Toxizität .	84
Tabelle 25: Korrelation zwischen c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen aufgegliedert nach Geschlecht.....	85
Tabelle 26: Allelfrequenzen von c.496A>G bzw. IVS10-15T>C, aufgegliedert nach 5-FU-assoziiertes Toxizitätszuordnung (°III - °IV vs. < °III) im Vergleich mit Literaturangaben	88

Tabelle 27: Allelfrequenzen von c.1236G>A, aufgegliedert nach 5-FU-assoziierter Toxizitätszuordnung im Vergleich mit Literaturangaben..... 93

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs
AU	<i>Absorbance units</i>
bp	Basenpaar
CH ₂ -THF	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-Tetrahydrofolsäure
CMF	Cyclophosphamid, Methothrexat und 5-Fluorouracil
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
DPYD/DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FA	Folinsäure = Leukovorin
FAC	5-Fluorouracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FdUMP	Fluorodeoxyuridinmonophosphat
FEC	5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid
FH ₄	Tetrahydrofolsäure (veraltet THF)
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GI	Gastrointestinal
HF	Heterozygotenfrequenz
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
IDC	invasiv-duktales Karzinom
ILC	invasiv-lobuläres Karzinom
INF	Interferon
Kb	Kilobase
KI	Konfidenzintervall
Lj	Lebensjahr
MTX	Methotrexat
OD	optische Dichte
OR	Odds Ratio

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

P	p-Wert
PBM	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PS/DVB	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymere
RKI	Robert Koch-Institut
RP-IP HPLC	<i>Reverse-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	round per minute
RR	relatives Risiko
RT	reverse Transkription
RTX	Strahlentherapie
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	T-Statistik
TEAA	Triethylammoniumacetat
TS	Thymidylatsynthase

1. Einleitung

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum für verschiedene solide Tumorentitäten. Es kann unter Umständen in erheblichem Maße zu Toxizitäten durch die Verabreichung von 5-Fluorouracil kommen. Eine der möglichen Ursachen hierfür ist in einem defekten Metabolismus von 5-FU zu finden, der in erster Linie durch eine veränderte Dihydropyrimidin-dehydrogenase (DPD) bedingt sein kann. Durch die Identifizierung von DPD-defizienten Patienten mittels Genotypisierung vor Chemotherapie könnte solchen 5-FU bedingten Nebenwirkungen z.B. durch eine Dosisreduktion entgegen gewirkt werden. Voraussetzung für ein solches genetisches Präscreening ist eine eindeutige Zuordnung, welche Sequenzveränderungen in dem für die DPD kodierenden Gen (DPYD) ursächlich für eine Unverträglichkeit durch 5-FU sein könnten. Die Einstufung einiger bereits bekannter DPYD-Polymorphismen hinsichtlich ihrer Relevanz für das Auftreten von Toxizität durch 5-FU-Applikation ist die zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Hierfür wurde ein Patientenkollektiv mit maligner Grunderkrankung unter chemotherapeutischer Behandlung mit 5-FU auf das mögliche Auftreten von Nebenwirkungen hin beobachtet. Diese Daten wurden anschließend mit dem jeweiligen individuellen, im Labor bestimmten Polymorphismusprofil korreliert.

Vor allem in Bereichen der Gynäkologie beim Mammakarzinom, als auch in der Gastroenterologie zur Behandlung von malignen Erkrankungen im Magen-Darm-Trakt findet 5-FU eine breite Anwendung. Das Grundleiden der untersuchten Patienten/-innen setzt sich deshalb in erster Linie aus diesen beiden Tumorentitäten zusammen.

Brustkrebs ist mit einem weltweiten Anteil von 22,9% bei steigenden Inzidenzraten (vgl. Robert Koch-Institut, 2010) die häufigste Krebserkrankung der Frau, sowohl in den Industriestaaten, als auch in Entwicklungsländern (vgl. Ferlay, Shin et al., 2010). Die Therapie des Mammakarzinoms baut auf mehreren Säulen auf. Mit der Operation wird der Tumor entfernt. Eine *Radiatio* soll etwaige übrig gebliebene Tumorzellen zerstören, um das Lokalrezidivrisiko zu senken. Eine adjuvante Chemotherapie hat die Intension, die Entstehung

von Metastasen durch bereits in den Körper gelangte, aber noch nicht nachweisbare Tumorzellen zu unterbinden. Sowohl Bestrahlung als auch Chemotherapie können bei ausgedehnten Befunden auch neoadjuvant sinnvoll sein. Hierbei wird eine der beiden Therapien vor der Operation durchgeführt, um einerseits überhaupt erst die Operabilität zu erreichen, andererseits, im Falle eines lokal weit fortgeschrittenen Mammakarzinoms, um eine brusterhaltende Operationsmethode zu ermöglichen. Eine adjuvante endokrine Therapie z.B. mit Tamoxifen und der Einsatz des Biologikums Trastuzumab entsprechend des Hormonrezeptor- bzw. HER2-/neu-Status bringt die Behandlung des Mammakarzinoms immer weiter in Richtung einer individuell angepassten Krebstherapie (vgl. Eiermann et al., 2009, S.143 ff).

5-Fluorouracil nahm in der Vergangenheit einen hohen Stellenwert in der chemotherapeutischen Behandlung des Mammakarzinoms ein.

Maligne gastrointestinale Tumoren bilden eine sehr heterogene Gruppe. Man unterscheidet das ösophageale Plattenepithelkarzinom von einem Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs (AEG). Hiervon abzugrenzen ist wiederum das eigentliche Magenkarzinom. Kolorektale Karzinome bilden eine große Gruppe innerhalb der Neoplasien des Magen-Darm-Traktes, jedoch auch insgesamt unter den krebbsbedingten Erkrankungen in Deutschland (vgl. Heinemann, Engel et al. 2010, S.139). Während sich zwischen den Tumorentitäten im Magen-Darm-Trakt große Unterschiede bezüglich der Risikofaktoren, Inzidenzen und Mortalitätsraten, sowie der Prognose ergeben, ist zumindest bezüglich einer Chemotherapie eine Gemeinsamkeit zu nennen. Für alle Subentitäten dieser heterogenen Tumorgruppe kommt 5-Fluorouracil als Chemotherapieoption in Frage, sowohl in kurativer als auch palliativer Intention.

2. 5-Fluorouracil und die Dihydropyrimidindehydrogenase

2.1 Charakteristiken einer Chemotherapie mit 5-FU

5-Fluorouracil wurde 1962 von der Firma Hoffmann-La Roche auf den Markt gebracht (vgl. Hoffmann-La Roche, 2007). Bei der Substanz Capecitabine (Xeloda[®]) handelt es sich um eine weiterentwickelte, oral applizierbare Form von 5-FU.

Bis heute ist es ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum für die Krebsbehandlung solider Tumoren.

5-FU und Capecitabine finden vor allem bei Magenkarzinomen, kolorektalen Tumoren und beim Mammakarzinom eine breite Anwendung (vgl.

Aktories et Unger, 2013, S.911). Auch stellt es eine Therapieoption für maligne Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich dar.

In der Dermatologie wird 5-FU bei aktinischen Keratosen, Morbus Bowen und Basaliomen in topischer Form angewendet (vgl. Ruß, 2010, S.352). 5%ige Efudex[®]-Creme z.B. ist 5-FU-haltig.

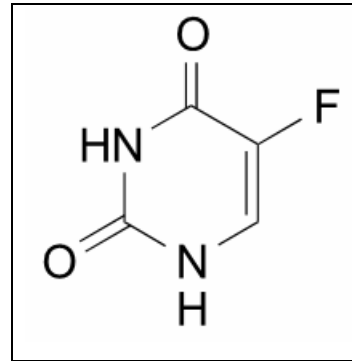


Abbildung 1: Strukturformel von 5-Fluorouracil (Longley, Harkin et al., 2003)

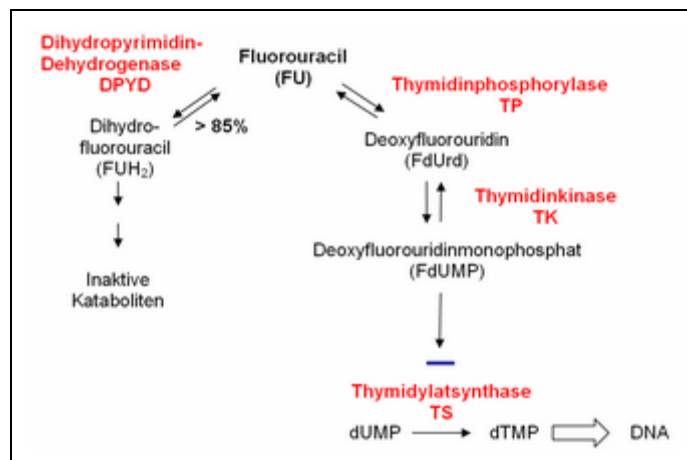


Abbildung 2: Stoffwechselweg von (Fluoro)pyrimidinen

(nach: Gross, Seck et al., 2002)

2.1.1 Wirkmechanismus

Das Fluoropyrimidin 5-FU (vgl. Abbildung 1) gehört zu den Antimetaboliten. Zur besseren Übersicht ist zunächst sowohl der anabole, als auch katabole Stoffwechselweg von 5-FU in Abbildung 2 dargestellt. Auf den Katabolismus wird im folgenden Kapitel (2.1.2 Abbau durch die Dihydropyrimidindehydrogenase, S.13) näher eingegangen.

Der anabole Metabolit des Pyrimidinanalogons 5-FU, 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), hemmt das Enzym Thymidylatsynthase (TS) (vgl. Abbildung 4). Dadurch wird die Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) verhindert. FdUMP bindet an die Nukleotidbindestelle der Thymidylatsynthase und bildet mit ihr und dem Methyl-Donor N5,N10-Methylen-Tetrahydrofolsäure (CH₂-THF) einen stabilen

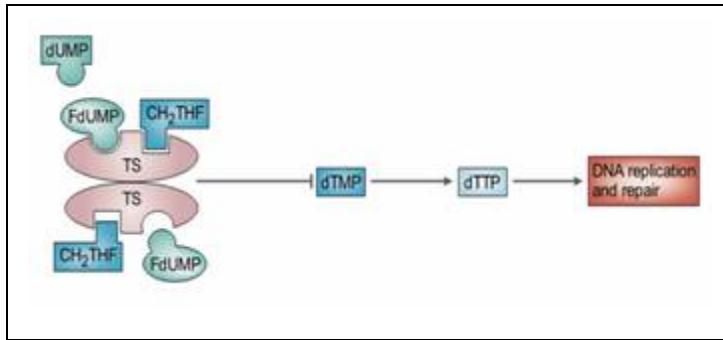


Abbildung 4: Wirkmechanismus von 5-Fluorouracil auf die Thymidylatsynthase

(Longley, Harkin et al., 2003)

DNA und RNA eingebaute 5-FU-Metaboliten zu einem zytotoxischen Effekt.

(vgl. Gross, Seck et al., 2002;

Longley, Harkin et al., 2003)

Der Gedanke liegt nahe, dass Patienten mit einer überproduzierten Thymidylatsynthase nicht auf eine 5-FU-Therapie ansprechen. Entsprechend konnte unter anderem in 5-FU-resistenten Lebermetastasen eine hochregulierte Thymidylatsynthase nachgewiesen werden (vgl. Wang, Diaz et al., 2004).

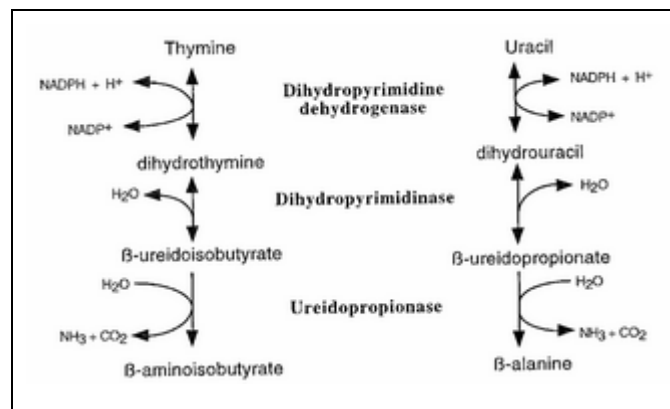


Abbildung 3: Reaktionskaskade des Pyrimidinkatabolismus

(van Kuilenburg, Van Lenthe et al., 2000)

2.1.2 Abbau durch die Dihydropyrimidinehydrogenase

Für eine erfolgreiche Chemotherapie mit 5-FU ist jedoch nicht nur die Aktivität der Thymidylatsynthase entscheidend. Der Erfolg ist wesentlich von der *in vivo* vorliegenden 5-FU-Konzentration abhängig, die in hohem Maße von dessen Abbau bestimmt wird. Die entscheidende Rolle im katabolen Stoffwechselweg

von 5-FU spielt hierbei als initiales und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym die Dihydropyrimidin-dehydrogenase (vgl. van Kuilenburg, Vreken et al., 1999).

Die unter physiologischen Umständen von der DPD katalysierte Reaktionskaskade im Pyrimidinkatabolismus kann in Abbildung 3 nachvollzogen werden. Entsprechend läuft auch der katabole Stoffwechselweg von 5-FU ab (vgl. Abbildung 5).

Die DPD enthält eine Bindungsstelle für das Substrat Thymin und Uracil bzw. 5-FU. Für die Katalyse werden als Kofaktoren Flavinadeninmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) benötigt, sowie NADPH als Elektronendonator (vgl. Yokota, Fernandez-Salguero et al., 1994). Darüber hinaus weist die DPD vier Eisen-Schwefel-Cluster auf, die an dem Elektronentransfer beteiligt sind (vgl. Dobritzsch, Ricagno et al., 2002).

Die entsprechenden Aminosäurepositionen,

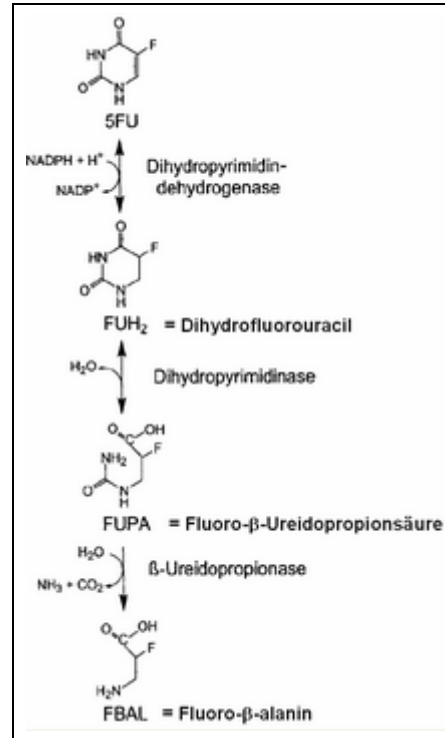


Abbildung 5: Der katabole Stoffwechselweg von 5-FU

(vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2003)

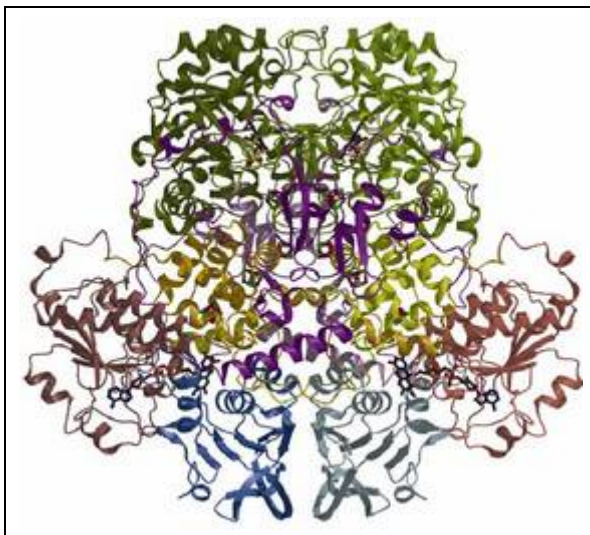


Abbildung 6: Gesamtstruktur einer Schweine-DPD

Die Kofaktoren sind mittels Stäbchenmodell dargestellt, wobei die Eisen-Schwefel-Cluster in den Farben Grün und Pink erscheinen.

(Schnackerz, Dobritzsch et al., 2004)

welche an dem Elektronentransfer, der Substratbindung oder der Interaktion mit Kofaktoren beteiligt sind, beschreiben hoch konservierte Areale der DPD (vgl. Mattison, Johnson et al., 2002). So konnte z.B. sowohl für die Uracil- bzw. 5-FU-, als auch für die NADPH-Bindungsstelle unter den Säugetieren, sowie im Vergleich mit *Drosophila melanogaster* eine 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuren gefunden werden (ibd.). Die Aminosäuresequenz der menschlichen DPD weist zur Sequenz des

Schweins mit 93% insgesamt die höchste Identität auf (ibd.). Entsprechend kann in Abbildung 6 anhand der Struktur der Schweine-DPD eine Vorstellung vom dreidimensionalen Aufbau der DPD mit den entsprechenden Domänen gewonnen werden.

Das für die DPD kodierende Gen wurde von Yokota et al. 1994 genauer beschrieben. Das DPYD-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p22) (vgl. Takai, Fernandez-Salguero et al., 1994) und beinhaltet 23 Exons, die sich über 950 kb erstrecken, von denen 3 kb kodierende Sequenz beinhalten (vgl. Wei, Elizondo et al., 1998). Das kodierte Protein umfasst 1025 Aminosäuren (vgl. Yokota, Fernandez-Salguero et al., 1994).

2.1.3 Pharmakokinetik

Die orale Bioverfügbarkeit von 5-FU ist schlecht, sodass die parenterale Gabe zwingend erforderlich ist. Im Gegensatz zur schlechten intestinalen Resorption ist die Liquorgängigkeit jedoch gut. (vgl. Aktories et Unger, 2005, S.939)

Die rasche Plasmaelimination von 5-FU schwankt interindividuell beträchtlich. Heggie et al. fanden Plasmahalbwertszeiten zwischen 5 und 27 Minuten nach 5-FU-Bolusgabe (vgl. Heggie, Sommadossi et al., 1987). Aufgrund dieser kurzen Halbwertszeiten fällt die Plasmakonzentration von 5-FU nach i.v. Bolusapplikation schnell auf Werte unterhalb der zytotoxischen Schwelle. In die Länge gezogene oder kontinuierliche Infusionen können die Aktivität erhöhen. (vgl. Johnston et Kaye, 2001)

Ursächlich für diese kurze Plasmahalbwertszeit ist einerseits die Tatsache, dass 5 – 20% der Dosis unverändert von den Nieren ausgeschieden werden. Viel ausschlaggebender ist jedoch die schnelle Inaktivierung durch die Leber. Vor allem hier werden an die 80% der verabreichten 5-FU-Menge durch die DPD unverzüglich in inaktive Metaboliten wie Dihydrofluorouracil und Fluoro- β -Ureidopropionsäure abgebaut. So stehen nicht einmal 3% des Wirkstoffes für die anabole Verstoffwechselung in den aktiven Metaboliten Deoxyfluorouridinmonophosphat zur Verfügung. (vgl. Daher, Harris et al., 1990)

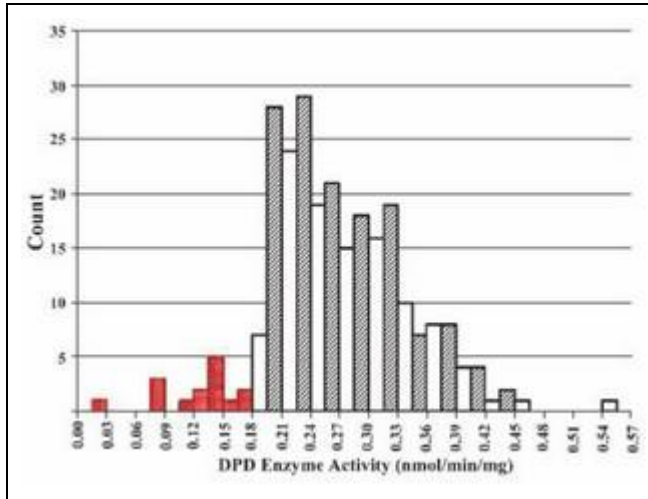


Abbildung 7: Verteilung der DPD-Aktivitäten in gesunden Afroamerikanern (n = 149; schraffiert) und Kaukasiern (n = 109; weiß)

In rot sind Individuen mit einer defizienten DPD dargestellt (DPD-Aktivität $\leq 0,18$ nmol/min/mg Protein). 12 Afroamerikaner waren DPD-defizient, im Gegensatz zu 3 Kaukasiern.

(Mattison, Fourie et al., 2006)

Die Aktivität der DPD schwankt, wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, interindividuell in der Bevölkerung erheblich. Hinzu kommen noch rassenspezifische Unterschiede (s. Abbildung 7). Mattison et al. verglichen die DPD-Aktivitäten von Kaukasiern und Afroamerikanern. Die DPD-Aktivitäten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes waren bei letzteren signifikant niedriger als bei Kaukasiern ($p=0,002$). Auch die DPD-Defizienz kam in der afroamerikanischen Bevölkerung 3-fach häufiger vor ($p = 0,07$) als in der kaukasischen (8,0% vs. 2,8%). (vgl. Mattison, Fourie et al., 2006)

Zudem konnten bezüglich der DPD-Aktivität geschlechtsspezifische Unterschiede gefunden werden. Diese ist bei Frauen durchschnittlich um 15% niedriger als bei Männern (vgl. Etienne, Lagrange et al., 1994). So überrascht es nicht, dass anteilig mehr Frauen schwerwiegende Nebenwirkungen erleiden als Männer (vgl. Sloan, Goldberg et al., 2002).

Während fast die Hälfte aller Frauen unter 5-FU-Therapie schwere

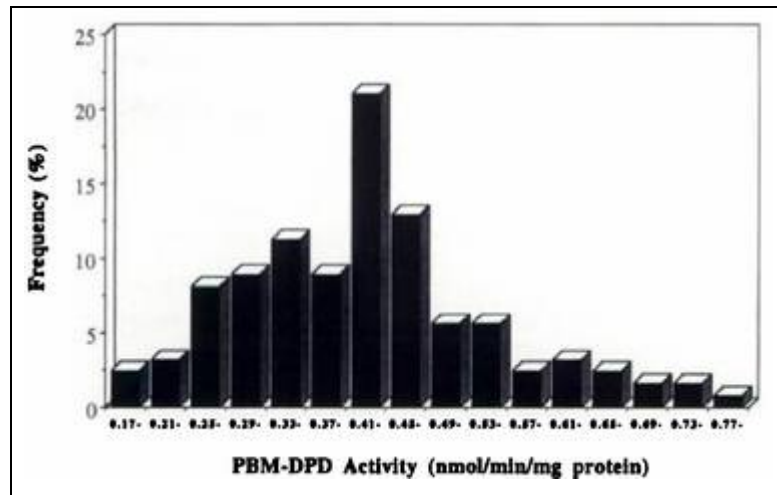


Abbildung 8: Die Aktivität der DPD in mononukleären Zellen des peripheren Blutes folgt der Normalverteilung

Die Aktivität der DPD wurde hier bei 124 gesunden Freiwilligen gemessen. Ein Auszug aus der Charakteristik dieses Kollektivs:

Männer n = 56 (45,2%) vs. Frauen n = 68 (54,8%)

Kaukasier n = 77 (62,1%) vs. Nicht-Kaukasier n = 47 (37,9%)

PBM = engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

(Lu, Zhang et al., 1993)

Toxizitätserscheinungen erleiden, ist unter Männern nur etwa ein Drittel betroffen (ibd.).

Die DPD-Aktivität unterliegt zudem einer zirkadianen Tagesrhythmik (vgl. Harris, Song et al., 1988). Harris et al. konnten im Rattenmodell die am Tageslicht orientierte Variabilität der DPD-Aktivität messen, dargestellt in Abbildung 9 (ibd.). Die maximale Enzymaktivität überschreitet dabei die minimale um mehr als das 7-fache (ibd.). Porsin et al. fanden bei Untersuchungen der DPYD-mRNA heraus, dass die maximale DPD-Aktivität 16 Stunden nach der maximalen DPYD-Expression zu beobachten ist (vgl. Porsin, Formento et al., 2003)

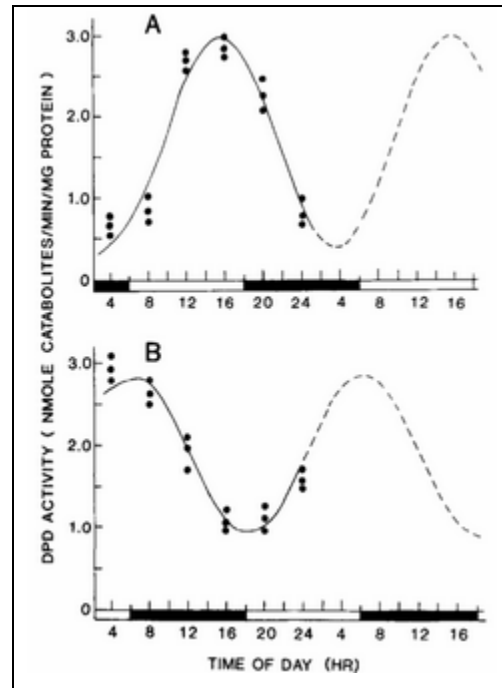


Abbildung 9: (A) Die zirkadiane Rhythmik der DPD in Rattenleber unter normalen Tagesbedingungen und (B) unter umgedrehten Lichtverhältnissen (mit Licht zwischen 18 Uhr und 6 Uhr)

(Harris, Song et al., 1988)

2.1.4 Orale Therapie mit Capecitabine

Eine neue Fortentwicklung der klassischen 5-FU-Therapie ist die orale Variante mit Capecitabine (Xeloda®), *N*(4)-Pentyloxycarbonyl-5'-desoxy-5-fluorcytidin (vgl. Miwa, Ura et al., 1998). Dieses Fluoropyrimidin-Carbamat kann im Gegensatz zu 5-FU oral verabreicht werden, bei einer oralen Bioverfügbarkeit von 70 – 80% (vgl. Chu et Sartorelli, 2009, S.947). Es handelt sich um eine Vorstufe von 5-FU. Der Stoffwechselweg von Capecitabine zu 5-FU ist in Abbildung 10 dargestellt.

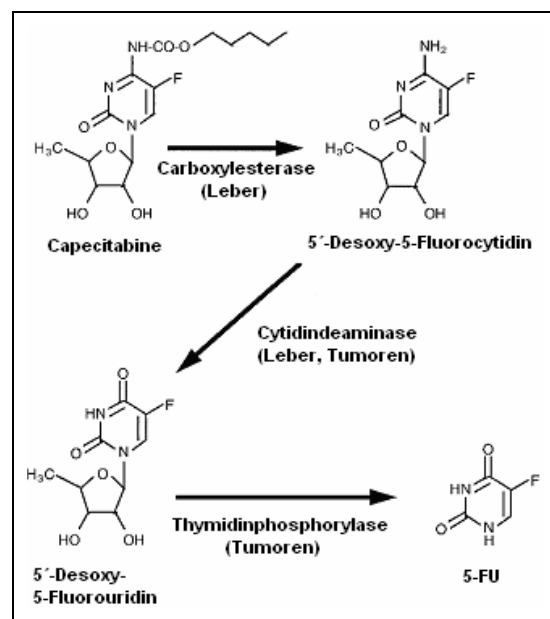


Abbildung 10: Stoffwechselweg von Capecitabine (nach: Miwa, Ura et al., 1998)

Capecitabine wird nach enteraler Resorption zunächst über die Carboxylesterase zu 5'-Desoxy-5-Fluorocytidin, anschließend durch die Cytidineaminase zu 5'-Desoxy-5-Fluorouridin verstoffwechselt. Der letzte Schritt der Metabolisierung zu 5-FU wird von der Thymidinphosphorylase katalysiert. Capecitabine und 5'-Desoxy-5-Fluorocytidin zeigen kaum antiproliferative Wirkung, im Gegensatz zu der hohen Zytotoxizität durch 5-FU, gefolgt von 5'-Desoxy-5-Fluorouridin. Während die Carboxylesterase fast ausschließlich in der Leber lokalisiert ist, die Cytidineaminase in hohen Konzentrationen in der Leber und in soliden Tumoren vorkommt, ist die Aktivität der Thymidinphosphorylase intratumoral deutlich erhöht zum normalen Gewebe. Somit entsteht das aktive 5-FU in erster Linie im Tumor und erzielt hier hohe Wirkspiegel. Capecitabine ahmt über die schrittweise Aktivierung eine kontinuierliche 5-FU-Infusion nach (vgl. Blum, 2001). (vgl. Miwa, Ura et al., 1998)

Capecitabine wird zur Erstlinientherapie sowohl des metastasierten Mammakarzinoms (vgl. Blum, 2001) als auch des metastasierten Kolonkarzinoms (vgl. Chu et Sartorelli, 2009, S.947) verwendet. Es kommt zudem in der adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms im Stadium III zum Einsatz (vgl. Reinacher-Schick, Arnold et al., 2010). Die XELOXA-Studie ergab unter anderem eine signifikante Überlegenheit von XELOX (Capecitabine und Oxaliplatin) gegenüber Bolus-5-FU/Leukovorin für das krankheitsfreie Überleben (vgl. Abbildung 11) (ibd.).

Capecitabine hebt als zweimal täglich eingenommenes orales Medikament nicht nur wesentlich

die Lebensqualität des Patienten, sondern schließt auch Risiken einer intravenösen Therapie aus, die mit einem Port oder peripheren bzw. zentralen Venenkathetern einhergehen.

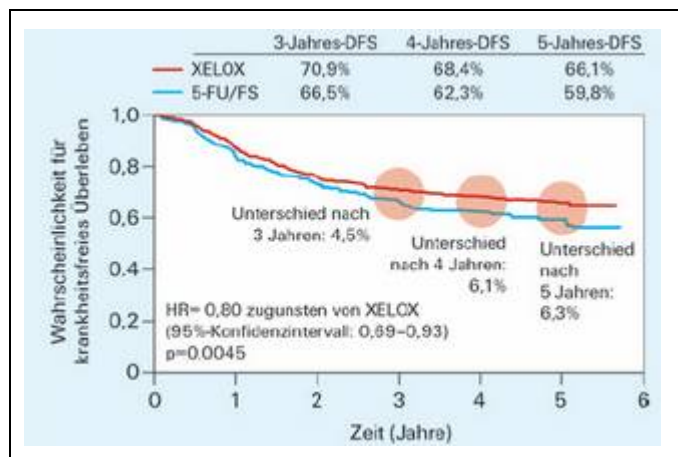


Abbildung 11: 5-Jahres-krankheitsfreies Überleben in der XELOXA-Studie

DFS= krankheitsfreies Überleben

5-FU/FS = 5-Fluorouracil/Folinsäure

Xelox = Capecitabine/Oxaliplatin

(Reinacher-Schick, Arnold et al., 2010)

2.1.5 Nebenwirkungen

Jede Chemotherapie führt, neben der gewünschten Wirkung auf die Tumorzellen, auch zur Schädigung anderer Gewebe, in erster Linie solcher mit einer schnellen Proliferation.

Die klassischen Nebenwirkungen unter 5-FU-Therapie treten im blutbildenden Knochenmark und im Gastrointestinaltrakt auf. Die Knochenmarkssuppression kann zu Leukopenie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie führen und ist dosislimitierend. Typische Symptome im Magen-Darm-Trakt sind die Mukositis, Stomatitis, Übelkeit bzw. Erbrechen und die Diarrhoe. Darüber hinaus können Hautreaktionen in Form von Dermatitis auftreten. Das Hand-Fuß-Syndrom beschreibt Hautablösungen an den Innenflächen von Hand und Fuß, die mit Schmerzen einhergehen können. Zudem sind neurotoxische Symptome oder eine Alopezie weitere mögliche Nebeneffekte einer 5-FU-haltigen Chemotherapie. In seltenen Fällen konnten Koronarspasmen beobachtet werden, die in histologisch nachweisbaren Myokardinfarkten enden können (vgl. Braumann, Mainzer et al., 1990). (vgl. Aktories et Unger, 2013, S.911)

Die „ECOG Common Toxicity Criteria“ ermöglichen eine passende Gradeinteilung für die Erfassung und Beschreibung von Nebenwirkungen unter Chemotherapie. Diese Einteilung ist im Anhang dargestellt.

Es gibt bestimmte Risikofaktoren für das Auftreten von solchen Nebenwirkungen. Die *Meta-analysis Group In Cancer* beschreibt „weiblich“, „höheres Alter“ und einen guten „ECOG Performance Status“ (vgl. Anhang) als prognostische Faktoren für nicht-hämatologische Toxizität. Frauen und Patienten mit höherem Lebensalter haben zudem ein größeres Risiko für die Ausbildung eines Hand-Fuß-Syndroms. (vgl. Meta-analysis Group In Cancer, 1998b).

Auch die Art der i.v. Applikation von 5-FU hängt eng mit dem Nebenwirkungsprofil zusammen (vgl. 2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen von 5-Fluorouracil, S. 22). Für die orale Therapie mit Capecitabine gilt, dass Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Übelkeit, Erbrechen und Mukositis

signifikant seltener auftreten als unter intravenöser 5-FU-haltiger Chemotherapie (vgl. Chu et Sartorelli, 2009, S.947). Die Hauptnebenwirkungen sind hierbei die Ausbildung von Diarrhoen oder eines Hand-Fuß-Syndroms (ibd.).

2.1.6 Wechselwirkungen

Das Virostatikum Brivudin (Zostex[®]), das bei Herpes-Zoster gegen das Varizella Zoster Virus und bei Infektionen mit dem Herpes simplex Virus vom Typ I eingesetzt wird, interagiert mit 5-Fluorouracil. Unter Brivudintherapie kann es bei einer zeitnahen Chemotherapie mit 5-FU oder anderen 5-Fluoropyrimidinen zu einer verstärkten Toxizität kommen. Dieser Effekt lässt sich auf die hemmende Wirkung des Brivudinmetaboliten Bromvinyluracil auf die Dihydropyrimidindehydrogenase zurückführen. Um dies zu vermeiden sollte ein zeitlicher Abstand zwischen den beiden Substanzen von mindestens 4 Wochen eingehalten werden. (vgl. Strahlmann et Lode, 2005, S.871)

Zudem kann es durch Metronidazol, Interferone, Thiaziddiuretika, Cimetidin oder Flucytosin möglicher Weise zu einer verstärkten Wirkung von 5-FU kommen (vgl. Weitz, Schalhorn et al., 2010, S.885).

2.1.7 Kombination mit anderen Substanzen

Da 5-FU als Monotherapie keine zufrieden stellende Therapieoption darstellt, hat man versucht, 5-FU mit anderen Substanzen zu kombinieren. Im Falle des Kolonkarzinoms als Beispiel liegen die Ansprechraten bei alleiniger 5-FU-Gabe nur bei 10 – 20% (vgl. Johnston et Kaye, 2001). Solch gerade beschriebene Wechselwirkungen mit 5-FU hat man versucht sich z.B. in der Kombination von Interferon (INF) und 5-FU für ein besseres Tumoransprechen zunutze zu machen (vgl. Jäger, Bernhard et al., 1995). Auch ist es möglich durch ein Eingreifen in den 5-FU-Katabolismus dessen Wirkung zu verstärken. Eniluracil (5-Ethynyluracil) z.B. ist ein nichtkompetitiver Inhibitor der DPD und potenziert damit die Wirkung von 5-FU durch eine Erhöhung von dessen Bioverfügbarkeit (vgl. Sharma et Saltz, 2000).

Bis heute klinisch relevant ist eine Kombination aus 5-FU und Leukovorin. Hierbei kommt es durch die Erhöhung von reduziertem Folat zu einer Stabilisierung des Komplexes aus FdUMP, dem aktiven Metaboliten von 5-FU, und der Thymidylatsynthase (vgl. Park, Collins et al., 1988). Hieraus resultiert eine effektivere Hemmung der DNA-Synthese (ibd.). Die Ansprechraten konnten beim Kolonkarzinom im Vergleich zur 5-FU-Monotherapie durch die Kombination mit Leukovorin von 14% auf 25% gesteigert werden (vgl. Grem, 1997).

Bei der zusätzlichen Gabe des Platinderivats Oxaliplatin zu 5-FU/Leukovorin konnte bei Kolonkarzinomen ein Ansprechen von 53% beobachtet werden (vgl. Giacchetti, Perpoint et al., 2000). Auch eine Erweiterung der 5-FU/Leukovorin Therapie um den Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan brachte hier eine Steigerung der Ansprechrate auf 49% (vgl. Douillard, Cunningham et al., 2000).

Alternativ zur Kombination mit Leukovorin kann eine 5-FU Monotherapie auch um die Substanz Levamisol erweitert werden. Hierbei handelt es sich um einen synthetisierten Immunmodulator, der ursprünglich gegen Parasiten angewandt wurde (vgl. Ferenčik, Rovenský et al., 2006, S.277). Es ist ein stimulierender Effekt auf Makrophagen, T-Lymphozyten und Neutrophile beschrieben (ibd.). Heutzutage wird Levamisol vor allem in der Pädiatrie zur Verbesserung der Rückfallquote unter Cortisontherapie beim nephrotischen Syndrom verwendet (vgl. Hodson, Willis et al., 2008). Die genaue Wirkweise in der Kombinations-therapie mit 5-Fluorouracil gegen maligne Tumoren bleibt unklar (vgl. Friis, Engel et al., 2005). Es konnte *in vitro* ein hemmender Effekt auf die Angiogenese, *in vivo* ein hemmender Effekt auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden (ibd.). Für die Behandlung von malignen kolorektalen Tumoren Stadium II und III wird die Kombination 5-FU/Levamisol als genauso effektiv beschrieben wie 5-FU/Leukovorin (vgl. Figer, Nissan et al., 2011). Für die weibliche Untergruppe ist 5-FU/Levamisol eventuell sogar überlegen (ibd.). Betreffend der Tumorentität Mammakarzinom ist eine Aussage bezüglich Überlegenheit schwierig. 1979 wurde ein Studienarm mit der Kombination 5-FU/Levamisol aufgrund häufiger, starker Nebenwirkungen und einer signifikant höheren Rezidivrate frühzeitig geschlossen (vgl. Executive

Committee of the Danish Breast Cancer Cooperative Group, 1980). Ejlertsen et al. fanden für diesen Studienarm einen möglichen, nach 5 Jahren auftretenden Langzeitüberlebensvorteil (vgl. Ejlertsen, Mouridsen et al., 2010). Aufgrund der vorzeitigen Beendigung dieser Studiengruppe hatte diese Beobachtung jedoch eine niedrige *Power* (ibd.).

Eine weitere Substanz zur Kombination mit 5-FU ist der Folsäure-Antagonist Methotrexat (MTX). Es beeinflusst den Stoffwechsel von $\text{CH}_2\text{-THF}$ (vgl. 2.1.1 Wirkmechanismus, S.12). $\text{CH}_2\text{-THF}$ überträgt in der durch die Thymidylatsynthase katalysierten Reaktion auf dUMP eine Methylgruppe, es entsteht dTMP. Um in einer erneuten Reaktion wieder als Methyl-Donor zur Verfügung zu stehen, wird das nun vorliegende Dihydrofolat durch das Enzym Dihydrofolat-Reduktase in Tetrahydrofolsäure (FH₄, veraltet THF) umgewandelt. Methotrexat hemmt die Dihydrofolat-Reduktase und führt durch den Mangel an Tetrahydrofolsäure zu einer indirekten Hemmung der Thymidylatsynthase. (vgl. Aktories et Unger, 2005, S.936).

Ein Synergismus zwischen 5-FU und Methotrexat entsteht nur, wenn MTX vor der 5-FU-Applikation verabreicht wird (vgl. Aktories et Unger, 2013, S.911).

Die Kombination Methotrexat mit 5-FU kommt im Falle des Mammakarzinoms im CMF-Schema zum Einsatz.

Von Bedeutung für das Mammakarzinom sind zudem 3-fach Kombinationen zwischen 5-FU und Cyclophosphamid mit Anthrazyklinen, wie Epirubicin (FEC-Schema) oder Doxorubicin (FAC-Schema).

2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen von 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil wird intravenös verabreicht, wobei für die Plasmakonzentration die Applikationsart entscheidend ist. Es gibt entweder die Möglichkeit der Bolusgabe, oder die der kontinuierlichen Dauerinfusion über mehrere Stunden bis Tage. Bei schneller Injektion erreicht 5-FU im Plasma und Knochenmark hohe Konzentrationen, die nicht lange andauern, während bei langsamer Dauerinfusion niedrige Level lange aufrechterhalten werden (vgl. Fraile, Baker et al., 1980). Dies führt hinsichtlich des Nebenwirkungsspektrums zu entscheidenden

Unterschieden zwischen den beiden Darreichungsformen. Während hämatologische Nebenwirkungen °III oder °IV signifikant häufiger bei schnellen Bolusapplikationen vorkommen, sind Hand-Fuß-Syndrome bei Dauerinfusionen signifikant häufiger (vgl. Meta-analysis Group In Cancer, 1998a). Die Häufigkeiten von Diarrhoe, Übelkeit/Erbrechen und Mukositis unterscheiden sich zwischen den beiden Applikationsarten nicht (ibd.). Toxizitätsreaktionen sind insgesamt bei kontinuierlichen 5-FU-Dauerapplikationen verglichen mit Bolusgaben seltener (vgl. Köhne, Vanhoefer et al., 2002).

Mit dem zunehmenden Wechsel der 5-FU-Applikationsart von der alleinigen Bolustherapie hin zu kontinuierlichen Dauerinfusionen oder Kombinationsregimen, kann insgesamt eine größere 5-FU-Dosis appliziert werden. Die dosislimitierenden Nebenwirkungen verschieben sich dabei von der Knochenmarksuppression bei Bolusgabe hin zu Stomatitiden und Hand-Fuß-Syndromen bei kontinuierlicher Dauerapplikation. (vgl. Meta-analysis Group in Cancer, 1998a)

Hinsichtlich der Wirkungsweise werden ebenfalls Unterschiede zwischen kurzer, schneller Applikation und langsamer Infusion vermutet. So soll eine dauerhafte Darreichungsform effektiver für die Inhibierung der Thymidylat-synthase sein, während eine kurzfristige Exposition die Aufnahme von 5-FU in die RNA fördert (vgl. Aschele, Sobrero et al., 1992). *Die Meta-analysis Group In Cancer* beschreibt die Dauerinfusion von 5-FU bezüglich Tumoransprechraten bei fortgeschrittenen kolorektalen Tumoren als der 5-FU-Bolusgabe überlegen, was zu einer geringfügigen Verbesserung des Gesamtüberlebens führt (vgl. Meta-analysis Group In Cancer, 1998a).

2.1.9 5-FU- bzw. Capecitabine-haltige Chemoschemata

Eine große Auswahl vor allem der aktuelleren Kombinationen mit 5-FU und Capecitabine, welche im Patientenkollektiv (vgl. 5.1 Rekrutierung des Patientenkollektivs, S.57) zum Einsatz kamen, sind im Anhang dargestellt.

2.2 Problematik einer 5-FU-haltigen Chemotherapie

2.2.1 Komplette und partielle Defizienz der DPD

Bei der durch eine Thyminuracilurie charakterisierten kompletten DPD-Defizienz handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Hierbei liegt meistens (68%) eine der bekannten Mutationen homozygot vor, in den übrigen Fällen handelt es sich um *compound*-Heterozygotie. Durch die gestörte DPD-Aktivität kommt es zu einer veränderten β -Alanin-, Uracil- und Thyminhomöostase. Dies erklärt höchstwahrscheinlich die vielfältigen klinischen Symptome. Neben der typischen Thyminuracilurie leidet ungefähr die Hälfte der Betroffenen an cerebralem Anfallsleiden, motorischer und mentaler Retardierung. Weniger häufig kommt es zu Wachstumsretardierung, Microzephalus, Autismus, Fehlbildungen und Veränderungen an den Augen. Bei allen der 1999 von van Kuilenburg et al. untersuchten symptomatischen 20 Patienten traten die ersten Symptome bereits in der Kindheit auf, bei der Mehrheit in den ersten Lebensjahren. Jedoch wurden auch zwei asymptomatische Träger gefunden. (vgl. van Kuilenburg, Vreken et al., 1999)

Für Betroffene einer kompletten DPD-Defizienz stellt eine Therapie mit 5-FU eine absolute Kontraindikation dar (vgl. Gross, Seck et al., 2002).

Während die meisten Patienten mit einer kompletten DPD-Defizienz bereits in der Pädiatrie früh klinisch auffällig werden, gibt es neben wenigen asymptomatischen komplett DPD-defizienten Menschen viele mit einer partiellen DPD-Defizienz, die unter normalen Umständen in der Regel einen unauffälligen Phänotyp aufweisen. Bei diesem Kollektiv kann unter Therapie mit 5-FU eine schwere Toxizität bis hin zum Tod auftreten (vgl. Raida, Schwabe et al., 2001). Deshalb ist zu erwägen, unter den Krebspatienten, denen eine 5-FU-haltige Therapie appliziert werden soll, solche Patienten mit einer partiellen DPD-Defizienz standardmäßig mit Hilfe von Tests prätherapeutisch zu identifizieren, um die unter Umständen schwerwiegenden Nebenwirkungen einer solchen Therapie zu verhindern.

Patienten mit starken Nebenwirkungen können häufig nach dem Abbruch der initialen Chemotherapie erst nach einer gewissen Latenzzeit wieder eine, aufgrund der malignen Grunderkrankung jedoch dringend zeitnah benötigte

Chemotherapie erhalten. In diesen Fällen ist der Nutzen einer Therapie mit 5-FU gering, sie ist vielmehr hinderlich und risikobehaftet. Jedoch sollte einem therapiebedürftigen Patienten die Chemotherapie auch nicht unnötig vorenthalten werden.

Problematisch ist vor allem bei Kombinationstherapien mit mehreren Wirkstoffen eine rein klinische Zuordnung der aufgetretenen Nebenwirkungen zu einem Wirkstoff, z.B. zu 5-FU. Zudem ist bei kombinierten Chemotherapien die Einordnung schwierig, welche Nebenwirkungen noch im Rahmen liegen und welche die übliche Nebenwirkungsstärke überschreiten.

Die beschriebene geringe Verfügbarkeit von 5-FU für den anabolen Stoffwechselweg und die damit verbundene Notwendigkeit der Verabreichung relativ hoher Dosen macht deutlich, wie stark die Variabilität der DPD-Aktivität die Menge des entstehenden aktiven Metaboliten von 5-FU beeinflussen kann (vgl. 2.1.2 Abbau durch die Dihydropyrimidinehydrogenase, S.13). So kann es bei gleichen Dosen sowohl zu einem Nichtansprechen als auch zu Toxizität kommen (vgl. Diasio, 2001). Schwab et al. untersuchten die Nebenwirkungen einer 5-FU-Monotherapie oder 5-FU-Kombinationstherapie mit Leukovorin sowie Levamisol bei 683 Patienten. Hier kam es unter 16,1% zu Toxizitätserscheinungen °III - °IV (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008). Eine Metaanalyse über 1219 Patienten mit Kolon- oder Rektum-Ca zeigte nach 5-FU-Bolusgabe bei 31% eine hämatologische Toxizität °III - °IV und nach kontinuierlicher 5-FU-Infusion bei 34% ein Hand-Fuß-Syndrom (vgl. Meta-analysis Group in Cancer, 1998b). Unter 5-FU-haltiger Therapie kamen hierbei 6 Patienten (0,5%) sogar zu Tode (ibd.). Diese Daten unterstreichen die enorme toxische Potenz von 5-Fluorouracil bei geringer therapeutischer Breite.

Es wäre von Vorteil, Patienten mit einer partiellen DPD-Defizienz bzw. mit einem erhöhten Toxizitätsrisiko auch ohne chemotherapeutische Konfrontation mit 5-FU mittels Tests identifizieren zu können. Derzeit stehen mehrere spezielle Verfahren zur Verfügung, wie z.B. der 2-¹³C-Uracil Atemtest (vgl. Mattison, Ezzeldin et al., 2004) oder die Bestimmung der plasmatischen Uracil/Dihydrouracil Ratio (vgl. Ben Fredj, Gross et al., 2009; Ciccolini, Mercier et al., 2006; Gamelin, Boisdron-Celle et al., 1999; Zhou, Wang et al., 2007).

Über solche indirekten, die Aktivität der DPD betreffenden Marker hinaus ist es möglich die DPD-Aktivität direkt zu messen. Im klinischen Alltag spielen diese Methoden jedoch eine äußerst untergeordnete Rolle. Ursachen hierfür sind wohl eine geringe Verfügbarkeit, die Kosten und eine geringe Bekanntheit dieser Tests. Hinzu kommt bezüglich der direkten Testung der DPD-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBM) zudem eine unklare Datenlage. Die DPD-Aktivität scheint nicht zwingend Rückschlüsse auf eine Gefährdung für 5-FU-bedingte Toxizität zuzulassen. Di Paolo et al. fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der gemessenen DPD-Aktivität und der 5-FU Verstoffwechslung respektive einer 5-FU Toxizität (vgl. Di Paolo, Danesi et al., 2001). Auch Etienne et al. sahen keine Verbindung zwischen der DPD-Aktivität vor Therapie und dem Risiko, Nebenwirkungen unter 5-FU-haltiger Chemotherapie zu bekommen (vgl. Etienne, Lagrange et al., 1994). Fleming et al. hingegen konnten eine lineare Beziehung der DPD-Aktivität in Lymphozyten und der systemischen 5-FU Verstoffwechslung nachweisen (vgl. Fleming, Milano et al., 1992).

Die Messung der DPD-Aktivität mittels DPD-Enzymtest erfolgt entweder mit isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes, mit kultivierten Fibroblasten oder aber mit präparierten Leberzellen. Als Substrat wird unter anderem (4-¹⁴C)-Thymin zugegeben. Nach Ablauf der Reaktionskaskade (vgl. Abbildung 3) werden die Reaktionsprodukte und das radioaktiv markierte Thymin mittels HPLC voneinander getrennt und darüber die DPD-Aktivität berechnet. (vgl. van Kuilenburg, van Lenthe et al., 2000)

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Patienten mit partieller DPD-Defizienz und erhöhtem Risiko unter 5-FU starke Nebenwirkungen zu erleiden, stellten Gamelin et al. mit einer 5-FU-Plasmakonzentrationsmessung vor (vgl. Gamelin, Delva et al., 2008). Hierbei wird mit einer initialen 5-FU-Dosis von 1500 mg/m² als Dauerinfusion über 8 Stunden begonnen. Anschließend werden die Plasmaspiegel bestimmt und die 5-FU-Dosis wird für die nächste Applikation angepasst (ibd.). Auch so können vermeintliche Träger einer partiellen DPD-Defizienz identifiziert werden, jedoch ist hierbei eine Konfrontation mit 5-FU erforderlich. Im günstigsten Fall kann jedoch so noch vor dem Auftreten von Nebenwirkungen die Dosis reduziert werden. Im

gegenteiligen Fall eines beschleunigten Abbaus kann über eine Dosiserhöhung eventuell ein Nichtansprechen des Tumors verhindert werden.

Im Vergleich zu diesen genannten Möglichkeiten scheint eine genetische Testung auf klinisch relevante SNPs die einfachste Möglichkeit zu sein, Hochrisikopatienten für mögliche lebensbedrohliche Nebenwirkungen zu identifizieren (vgl. Gross, Busse et al., 2008). Genetische Analysen haben den Vorteil einer großen Verfügbarkeit bei geringem Kostenaufwand. Zudem liefern sie schnelle Ergebnisse, da viele Proben auf einmal untersucht werden können. Hinzu kommt ein Komfort für die Patienten, da nur eine Blutabnahme nötig ist, die in den meisten Fällen zur Kontrolle von Blutwerten vor oder während einer Chemotherapie in jedem Fall gemacht worden wäre.

Als nachteilig ist bei genetischen Analysen jedoch generell die schlechte Beurteilbarkeit der Ergebnisse einzustufen. Man sieht viele häufige Varianten, sowie seltenere Mutationen. Jedoch ist in vielen Fällen völlig unklar, welche Auswirkungen diese Veränderungen auf die Proteinstruktur bzw. auf die Enzymstruktur haben. Zudem lassen sich selbst bei nachteiligem Effekt auf die DPD-Aktivität nicht zwingend Rückschlüsse auf ein Auftreten von Toxizität im Zusammenhang mit 5-FU ableiten (vgl. Etienne, Lagrange et al., 1994; Di Paolo, Danesi et al., 2001). Auch sind abgesehen von Polymorphismen andere Ursachen für eine veränderte Enzymaktivität denkbar. Van Kuilenburg et al. konnten bei 5-FU-intoleranten Patienten jedoch zumindest in 57% der Fälle, bei denen tatsächlich auch die Aktivität der DPD reduziert war, eine molekulare Basis dafür nachweisen (vgl. van Kuilenburg, Haasjes et al., 2000).

2.2.2 Genetische Ursachen der DPD-Defizienz

Für das DPYD-Gen sind viele verschiedene Sequenzveränderungen beschrieben, sowohl in der kodierenden Region, als auch in den Intronbereichen, sowie an den Exon-Intron-Grenzen. Deren Einfluss auf die Funktion und Aktivität des resultierenden Enzyms ist nicht immer eindeutig zu klären. Es sind einerseits sowohl Mutationen möglich, deren homozygotes Vorliegen zu einer klinisch, meist schon in der Pädiatrie auffallenden kompletten DPD-Defizienz führt, die bei heterozygoter Ausprägung jedoch einen klinisch meist

unauffälligen Phänotyp nach sich ziehen (vgl. van Kuilenburg, Vreken et al., 1999). Auffällig werden die heterozygoten Träger solcher Mutationen unter Umständen erst unter fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie (ibd.). Auch eine *compound*-Heterozygotie ist möglich, bei der beide Chromosomen betroffen sind, allerdings von unterschiedlichen Mutationen (ibd.).

Bei einer partiellen DPD-Defizienz ist entweder nur ein Allel betroffen oder aber die Funktion der DPD wird durch die Art der Mutation nur zum Teil beeinträchtigt (vgl. Gross, Seck et al., 2002).

Andererseits können Sequenzveränderungen harmlose Varianten sein, ohne jegliche Wirkung auf das Enzym.

Unter den Mutationen, die bei Patienten mit schwerer 5-FU-assoziiierter Toxizität gefunden werden, wurde in der Vergangenheit die Spleißmutation IVS14+1G>A als die häufigste beschrieben (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2002a). Van Kuilenburg et al. untersuchten 1357 Kaukasier auf das Vorliegen der Spleißmutation IVS14+1G>A und ermittelten eine Heterozygotenfrequenz von 1,8% (vgl. van Kuilenburg, Muller et al., 2001). Da keine homozygoten Träger gefunden wurden, entspricht dies einer Allelfrequenz von 0,91% (ibd.).

Bei dieser Punktmutation kommt es durch das Ersetzen von G durch A zu einer Veränderung in der GT-Spleißerkennungssequenz von Intron 14 mit großem Effekt. Es resultieren eine Deletion des 165 bp großen Exons 14 und ein defektes DPD-Protein. Dieser Defekt ist teils mit schweren Nebenwirkungen vergesellschaftet, kann sogar bei nur topischer Anwendung mit 5%iger Efudix[®]-Creme (in Dtl. Efudex[®]) lebensbedrohlich verlaufen. (vgl. Johnson, Hageboutros et al., 1999; Vreken, van Kuilenburg et al., 1996; Wei, Mcleod et al., 1996)

Van Kuilenburg et al. fanden in 28% aller Patienten mit schwerer Toxizität die Spleißmutation IVS14+1G>A (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2002a), unter denen mit identifizierten niedrigen DPD-Aktivitätsleveln sogar in 56% der Fälle (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2002b). Darüber hinaus wurde bei Patienten, die unter 5-FU-Therapie eine Neutropenie °IV entwickeln, in 50% der Fälle diese Spleißmutation hetero- oder homozygot nachgewiesen (ibd.). Doch geht IVS14+1G>A nicht immer mit einer erniedrigten DPD-Aktivität einher

(vgl. van Kuilenburg, Meisma et al., 2002a; van Kuilenburg, Meisma et al., 2002b). So fanden van Kuilenburg, Meisma et al. bei einem Patienten trotz heterozygoter IVS14+1G>A Mutation eine normale DPD-Aktivität (ibd.). Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die DPD-Aktivität interindividuell unabhängig von vermeintlichen Mutationen an sich schon stark schwankt (vgl. 2.1.3 Pharmakokinetik. S.15). Dies hängt mit Gen-Enzymregulationsmechanismen zusammen, die z.B. auch die zirkadiane Rhythmik der DPD-Aktivität erklären. Bei einem Individuum

mit einer angenommenen *per se* hoch regulierten DPD-Aktivität, könnte eine beispielsweise heterozygote Mutation mit starkem Effekt die Gesamtaktivität zwar auf ein niedrigeres, jedoch im Vergleich weiterhin noch normales Level reduzieren. In Abbildung 12 kann dies besser nachvollzogen werden. Hier sind die DPD-Aktivitäten in einem Kontrollkollektiv denen aus einem partiell DPD-defizienten Kollektiv gegenübergestellt (vgl. van Kuilenburg, Meisma et al., 2002b). Die beiden Normalverteilungskurven überlappen sich. Dementsprechend können sich auch die DPD-Aktivitäten von Wildtypindividuen mit denen von heterozygoten Trägern der IVS14+1G>A Spleißmutation über-

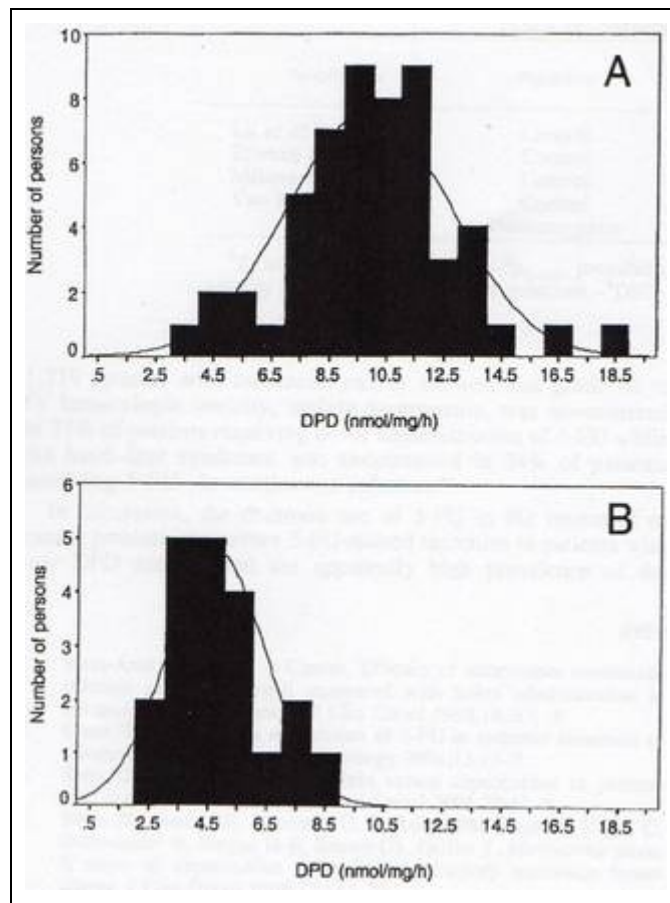


Abbildung 12: Die DPD-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (A) in der Kontrollgruppe und (B) in heterozygoten Trägern einer Mutation im DPD-Gen

Die durchgezogene Linie entspricht der Normalverteilung.

(van Kuilenburg, Meisma et al., 2002b)

denen von heterozygoten Trägern der IVS14+1G>A Spleißmutation überlappen.

Die Firma Oncoscreen, Jena, bietet einen Test zur Detektierung der Exon 14-Skipping Mutation an (vgl. Gross, Seck et al., 2002).

Mit IVS11+1G>T ist eine weitere Spleißmutation bekannt (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2005).

Neben vielen seltenen Mutationen mit Leserasterverschiebung, wie z.B. 295-298delTCAT (vgl. van Kuilenburg, Vreken et al., 1999), 1897delC (ibid.), 1039-1042delTG (vgl. van Kuilenburg, Dobritsch et al., 2002) und c.1109delTA (vgl. Gross, Busse et al., 2008), mit nahe liegendem Effekt auf die DPD-Aktivität und somit 5-FU-Verträglichkeit, ist die Auswirkung vieler häufiger Punktmutationen nicht bekannt. Solche Punktmutationen können entweder einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, oder sich als stille Mutationen ohne Aminosäureaustausch präsentieren.

Für die Klassifizierung dieser Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl.: *single nucleotide polymorphisms*) in solche mit therapierelevantem Risiko und solche ohne Risiko, sind unter anderem Strukturanalysen der DPD hilfreich. Hierdurch werden Konsequenzen für Funktion und Stabilität der DPD ersichtlich. So konnte unter anderem für den SNP c.2846A>T (Asp949Val) ein Effekt auf den Elektronentransfer bzw. die Bindung der Kofaktoren (vgl. 2.1.2 Abbau durch die Dihydropyrimidindehydrogenase, S.13) nachgewiesen werden. Auch c.1679T>G (Ile560Ser) beeinflusst höchstwahrscheinlich die strukturelle Unversehrtheit des Enzyms. (vgl. van Kuilenburg, Dobritsch et al., 2002)

Solche Mutationen mit eindeutigem Effekt auf das Enzym DPD können jedoch nur in einem begrenzten Anteil an Patienten das Auftreten schwerer Nebenwirkungen erklären (vgl. Collie-Duguid, Etienne et al., 2000; Magne, Etienne-Grimaldi et al., 2007; Schwab, Zanger et al., 2008). Jedoch konnten van Kuilenburg et al. mit einer Studie zeigen, dass eine DPD-Defizienz die Hauptdeterminante für eine 5-FU assoziierte Toxizität ist (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2002a). Denkbar als Ursache für erhöhte Sensitivität bzw. Toxizität gegenüber 5-FU sind neben einer vorliegenden DPD-Defizienz auch erhöhte Enzymaktivitäten im anabolen Stoffwechselweg von 5-FU (vgl. van Kuilenburg, Meinsma et al., 2002b).

Eine weitere Möglichkeit, DPYD-Varianten als mögliche Marker für die Vorhersagung einer schweren therapieassoziierten Toxizität zu identifizieren sind genetische Assoziationsstudien (vgl. Kleibl, Fidlerova et al., 2009; Gross, Busse et al., 2008). Es stellte sich heraus, dass zumindest bei bestimmten Tumorarten häufige SNPs deutlich dazu beitragen, dass Unverträglichkeitsreaktionen bei Therapien mit Fluoropyrimidinen auftreten (vgl. Gross, Busse et al., 2008). Träger solcher SNPs könnten von einer individuellen Dosisanpassung oder einer Umstellung auf ein alternatives Schema profitieren (ibd.).

3. Zielsetzung der Arbeit

Neben bereits erwähnten DPYD-Varianten waren in unserer Arbeitsgruppe unter anderem die Varianten c.496A>G und c.1236G>A auffällig geworden, mit fluoropyrimidinbedingten Nebenwirkungen in Zusammenhang zu stehen.

Während c.496A>G im Exon 6 des DPYD-Gens im Enzym zu dem Aminosäureaustausch Met166Val führt, handelt es sich bei c.1236G>A im Exon 11 um eine stille Mutation, die keinen Aminosäureaustausch im Enzym zur Folge hat (Glu412Glu) (vgl. Gross, Busse et al., 2008). c.496A>G ist eine relativ häufige Variante mit einer Allelfrequenz von ca. 8% in der kaukasischen Normalbevölkerung (ibd.), die häufig mit einer Mutation im Intron 10, IVS10-15T>C, zusammen auftritt. Die Häufigkeit des Allels IVS10-15T>C liegt unter Kaukasiern bei 11% (ibd.). Im Gegensatz dazu ist c.1236G>A als seltenere Veränderung beschrieben, deren Allelfrequenzen für gesunde Individuen mit 0,3% (vgl. Seck, Riemer et al., 2005) angegebenen werden, unter Tumorpatienten jedoch mit 3% (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008) eine nicht zu vernachlässigende Bedeutung vermuten lassen.

Die Polymorphismen c.496A>G und c.1236G>A können anhand von bestehenden Studien nicht eindeutig im Kontext 5-FU-assoziiierter Nebenwirkungen zugeordnet werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits in früheren Arbeiten sowohl für c.496A>G (vgl. Gross, Busse et al., 2008), als auch für c.1236G>A (vgl. Seck, Riemer et al., 2005), bei zu geringer Fallzahl jeweils eine Assoziation vermutet.

Aufgrund des noch nicht eindeutig erwiesenen Zusammenhangs zwischen c.496A>G und c.1236G>A mit schweren fluoropyrimidinbedingten Nebenwirkungen ist es Ziel dieser Arbeit, eine solche Assoziation bei größeren Fallzahlen zu untersuchen und gegebenenfalls zu erhärten. IVS10-15T>C wurde ebenfalls mit untersucht, obwohl durch diese Punktmutation im Intron 10 ohne Nachbarschaft zu Spleißstellen kein Effekt auf die DPD zu erwarten ist.

Im Zeitraum der Analysen von c.496A>G und c.1236G>A wurde von van Kuilenburg et al. die Mutation c.1129-5923C>G in Intron 10 des DPYD-Gens

entdeckt, die mit c.1236G>A gekoppelt zu sein schien. Diese Veränderung resultiert in einer kryptischen Donor-Spleißstelle, die zur Insertion eines 44 bp großen Fragments von Intron 10 in die reife mRNA führt. Dadurch kommt es über einen verschobenen Leserahmen zu einem frühzeitigen Stoppcodon in Exon 11. Die durch quantitative PCR ermittelte Ratio zwischen der veränderten Sequenz und der Wildtyp mRNA ergab 144% (± 6) für homozygote und 28% (± 13) für heterozygote Träger. (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010b)

Um zu erhärten, dass c.1129-5923C>G und c.1236G>A gekoppelt auftreten (ibd.) und in dieser Arbeit Proben auf den SNP c1236G>A untersucht wurden, sind die Analysen zusätzlich um die Intronmutation c.1129-5923C>G erweitert worden.

Es wurde die Häufigkeit von c.1129-5923C>G in einem, in der Arbeitsgruppe bereits bestehenden Kontrollkollektiv ermittelt, sowie ein Vergleich zwischen einem Patientenkollektiv mit aufgetretenen Nebenwirkungen °III und °IV und einem ohne oder mit nur milden Nebenwirkungen gezogen. Die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vorliegenden Daten wurden den Autoren van Kuilenburg, Meijer et al., 2010 zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit folgende Ziele angestrebt:

- Assoziation von c.496A>G mit 5-FU bedingter Toxizität wurde überprüft. Im Zuge dessen wurde zudem der gekoppelte SNP IVS10-15T>C untersucht.
- Assoziation von c.1236G>A mit 5-FU bedingter Toxizität wurde überprüft.
- Analysen zur Bestätigung der Kopplung zwischen c.1129-5923C>G und c.1236G>A wurden durchgeführt.
- Zusätzlich wurden Fälle mit aktuell aufgetretener Toxizität unter 5-FU-Therapie auf bekannte Mutationen im DPYD-Gen gescreent.

4. Material und Methodik

4.1 Chemikalien

Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Diaco, Triest, Italien
Bacto-Trypton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll™ PM 400	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x6H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.2 Kits und Bioreagenzien

100 bp DNA Ladder	Peqlab, Erlangen, Deutschland
10X PCR Buffer (15 mM MgCl ₂)	Applied Biosystems, Foster City, USA
AmpliTaq Gold™ 5 U/μl	Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
dTTP, dGTP, dATP, dCTP, je 100mM	Fermentas, Burlington, Kanada
First Strand cDNA Synthesis Kit für RT- PCR (AMV)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Gentra PUREGENE DNA Isolierungskit	Biozym, Hessisch Oldendorf,

MgCl₂ 25 mM Stock Solution

PAXgene™ Blood RNA Kit
Proteinase K (10mg/ml)
QuikChange II Site-Directed
Mutagenesis Kit
WAVE Optimized® Buffer A
WAVE Optimized® Buffer B
WAVE Optimized® Solution D
WAVE Optimized® Syringe Wash
Solution

Deutschland
Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim, Deutschland
Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Boehringer, Mannheim, Deutschland
Agilent Technologies, Santa Clara,
USA
Transgenomic, Omaha, USA
Transgenomic, Omaha, USA
Transgenomic, Omaha, USA
Transgenomic, Omaha, USA

4.3 Gebrauchswaren

96-Well-Vakuumplatte
Auslaufpipetten 10 ml
Falcon Röhrchen mit Deckel 15ml
Handschuhe
Klebefolie (DHPLC)
Magnet-Rührstäbe
Multi-Reaktionsgefäße 0,5/1,5 ml
PAXgene™ Blood RNA Tube
PCR-Folien (Microseal A Film)

PCR-Platten
(Thermowell 96 Well Plate)
PCR-Softstrips 0,2 ml, je 8 Tubes

Pipetten 2,5, 10, 100, 1000 µl

Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl
Präzisions-Dispenser Tips 1,25ml

Millipore, Billerica, USA
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sempercare, Wien, Österreich
Neolab, Heidelberg, Deutschland
Neolab, Heidelberg, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Biozym, Hessisch Oldenburg,
Deutschland
Corning Inc., Corning, USA

Biozym, Hessisch Oldenburg,
Deutschland
Rainin/ Mettler Toledo, Greifensee,
Schweiz
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

4.4 Technische Geräte

ABI PRISM 3130x/Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dampfsterilisator Varioklav®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DHPLC WAVE®	Transgenomic, Omaha, USA
Elektrophoresis Power Supply E835	Consort, Turnhout, Belgien
Fotografiergerät UV-Solo	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank + Gefrierschrank	Siemens, München, Deutschland
Magnetmixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
Nanodrop® ND1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Spektralphotometer	
PCR-Abzug Captair® bio	Erlab, Val de Reuil, Frankreich
pH-Meter	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Präzisionswaage	Kern, Balingen, Deutschland
PTC-200 Thermo Cycler	Biorad, München, Deutschland
Rotator	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat®	Braun Biotech. Int., Melsungen, Deutschland
Stepper HandyStep®	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge® 3 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge/Vortex	Peqlab, Erlangen, Deutschland

4.5 Lösungen, Puffer und Medien

10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)	510 g Tris, 275 g Borsäure, 37,2 g EDTA add 5000 ml Aqua dest
20% SDS	20 g SDS add 100 ml Aqua dest
DNA-Ladepuffer	7,5 g Ficoll in 30 ml Aqua dest + 100 µl TE; auf Rotator, bis durchsichtige Flüssigkeit; anschließend Farbstoff (Orange G) hinzufügen
dNTP-Mix (2 mM)	4 µl dATPs (100 mM), 4 µl dGTPs (100 mM), 4 µl dCTPs (100 mM), 4 µl dTTPs (100 mM) add 200 µl Aqua ad injectabilia
EDTA-Lösung (0,5 M)	37,24 g EDTA add 200 ml DEPC-Wasser (pH 8.0)
Lyse-Puffer	109,44 g Saccharose, 1,01 g MgCl ₂ ·6H ₂ O, 1,21 g Tris HCl, 10 ml TX-100 add 1000 ml Aqua bidest (pH 7,5) Lagerung bei 4°C, nur begrenzt haltbar
SE-Puffer	4,93 g NaCl, 8,41 g EDTA add 1000 ml Aqua bidest (pH 8,0); autoklavieren
TE-Puffer	1 ml Tris (1M Tris/HCl), 0,2 ml EDTA (0,5 M EDTA) add 100 ml Aqua bidest (pH 8,0) ;autoklavieren

4.6 Primer

Alle Primer stammen von der Firma Metabion GmbH, Deutschland.

Primer DPYD genomisch (2 µM)		PCR-Temp.	Fragmentlänge
Exon 2	for	62°C	285 bp
	rev		
Exon 4	for	50°C	245 bp
	rev		
Exon 6	for	52°C	357 bp
	rev		

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

Exon 10	for	5' GAGAGTGACACTTCATCCTGG 3'	51°C	342 bp
	rev	5' CTGTTGGTGTACAACTCC 3'		
Exon 11	for	5' ACTGGTAACTGAAACTCAG 3'	51°C	442 bp
	rev	5' CAATCCCTGAAAGCTAG 3'		
Exon 13	for	5' CGGATGACTGTGTTGAAGTG 3'	56°C	440 bp
	rev	5' TGTGTAATGATAGGTCGTGTC 3'		
Exon 14	for	5' TGCAAATATGTGAGGAGGGACC 3'	60°C	410 bp
	rev	5' CAGCAAAGCAACTGGCAGATTC 3'		
Exon 22	for	5' GAGCTTGCTAAGTAATTCAGTGGC 3'	56°C	291 bp
	rev	5' AGAGCAATATGTGGCACC 3'		
Intron 10	for	5' TCAGACCAAATCATCGCATT 3'	54°C/ 58°C	347 bp
	rev	5' TTCTCCTCATGGCACCCATA 3'		

Primer DPYD cDNA (10 µM) für cDNA-Analyse			PCR-Temp.
Exon 5	for	5' GAATTTCTGCCATTCTGTC 3'	57°C
Exon 6	rev	5' CAGACTTCTTGGCAAGTTCC 3'	57°C

4.7 EDV-Software

Excel XP	Microsoft, Seattle, Washington, USA
Data Collection Software	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
PASW Statistics 18	SPSS Inc., Chicago, USA
Word XP	Microsoft, Seattle, Washington, USA
WAVEMAKER™ Software	Transgenomic, Omaha, USA
Reference Manager 10	Reference Manager, San Francisco, USA
Sequencing Analysis Software v5.3.1	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Sequence Navigator 1.0.1	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
GeneScan™ Analysis 2.0.2	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

4.8 Isolierung genomischer DNA

Die Blutröhrchen wurden entweder bei Raumtemperatur oder im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut.

Zur Isolierung von DNA aus dem Vollblut wurden die zwei nachfolgenden, in der Arbeitsgruppe üblichen Protokolle verwendet. Beide Methoden dienen der schnellen DNA-Isolierung vor DHPLC-Analyse oder eventueller Sequenzierung. Für beide Protokolle wurden standardmäßig 3 ml Vollblut eingesetzt. War aufgrund eines nur geringen Blutvolumens eine Präparation von 1 ml oder 300 µl Blut gewünscht, wurden die Reagenzien entsprechend angepasst.

- a) 3 ml Blut wurden in ein 15 ml Falcon Tube gegeben und 3 Volumen Lysepuffer (vgl. 4.5 Lösungen, Puffer und Medien) hinzugefügt. Nach 30 min auf Eis und gelegentlichem vorsichtigem Schütteln wurde 15 min bei 4000 rpm und 4°C in der Multifuge[®] der Firma Heraeus zentrifugiert. Der Dekantierung des Überstandes folgte ein weiterer Lyse-Schritt, diesmal wurde 1 Volumen Lysepuffer zugefügt und für 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugierung für 15 min bei 4000 rpm und 4°C wurde erneut der Überstand vorsichtig verworfen. Zum Aufschluss von Zellwänden und Abbau von Proteinen (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.638) wurde dem Sediment 1,5 ml SE-Puffer (vgl. 4.5 Lösungen, Puffer und Medien), 7,5 µl Proteinase K und 75 µl 20% SDS zugesetzt. Die Falcon Tubes wurden über Nacht bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Am darauf folgenden Tag wurden die Falcons aus dem Wasserbad genommen. Im nächsten Schritt wurden nun 420 µl 6M NaCl hinzugefügt, für 15 sec auf dem Vortexer geschüttelt und für 15 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nun wurde der, die DNA enthaltende Überstand in ein neues, mit 3 ml Isopropanol gefülltes 15 ml Falcon Tube überführt und die Falcon Tubes bis zu 50 mal hin und her bewegt, bis weiße DNA-Fäden sichtbar wurden. Nach erneuter Zentrifugierung für 3 min bei 3000 rpm wurde die DNA als kleines weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 3 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss an die Zentrifugierung für 1 min bei 3000 rpm und der Dekantierung des Überstandes, musste

das Falcon Tube für 10–15 min auf dem Kopf stehend trocknen. Im Anschluss an die DNA-Hydrierung mit 100 µl TE-Puffer (vgl. 4.5 Lösungen, Puffer und Medien) erfolgte die Überführung in ein 1,5 ml Tube.

- b) Die zweite Methode wurde mit dem Gentra PUREGENE DNA Isolierungskit der Firma Biozym nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte kurz zusammen gefasst: Zunächst erfolgte mit der „RBC Lysis Solution“ die Lyse und mittels Zentrifugation die Entfernung der Erythrozyten, anschließend wurden mit der „Cell Lysis Solution“ die Leukozyten aufgeschlossen. Auf die RNase Behandlung wurde verzichtet. Die Proteinfällung erfolgte mit der „Protein Precipitation Solution“. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit Isopropanol gefällt und 70%igem Ethanol gewaschen. Zur DNA-Hydrierung wurde „DNA-Hydration Solution“ verwendet.

In beiden Fällen wurde die DNA-Lösung entweder 1 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert und zusätzlich über Nacht bei Raumtemperatur gelöst, oder nur bei Raumtemperatur gelöst, dann jedoch über mehrere Tage.

Nach erfolgter Messung (vgl. 4.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren, S.40) wurde ein Teil der DNA-Stamm-Lösung mit TE-Puffer bzw. „DNA Hydration Solution“ auf 10 ng/µl verdünnt und aliquotiert. Im Falle einer Konzentration der Stammlösung von >1000 ng/µl erfolgte eine entsprechende Verdünnung der gesamten Stammlösung. Die Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C oder für längerfristige Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

4.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Nach ausreichender Lösung der DNA nach Präparation auf dem Rotator wurden die DNA-Konzentrationen mittels NanoDrop® ND1000 Spektralphotometer der Firma Peqlab bestimmt. Hierzu wurden nach vorheriger Messung von H₂O und TE-Puffer als Leerwert, 1 – 2 µl der Stammlösung auf den Messsockel des Gerätes pipettiert. Zwischen dem anschließend

heruntergeklappten Messarm und dem Messsockel spannt sich dann automatisch der Tropfen DNA-Lösung.

Die Messkurve sollte eine eindeutige Kurve mit einem nukleinsäuretypischen Absorptionsmaximum bei 260 nm ergeben. Diesem Maximum liegen die Absorptionen der aromatischen Ringe der Basen in der DNA zugrunde. Für die Abschätzung der Reinheit der jeweiligen Nukleinsäurelösung lässt sich der Quotient aus der optische Dichte (OD, engl. *absorbance*) bei 260 nm mit der optischen Dichte bei 280 nm heranziehen. Da das Absorptionsmaximum von verunreinigenden Proteinen aufgrund der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm liegt, ist der OD_{260}/OD_{280} -Wert bei Vorliegen von Proteinen niedriger als bei einer reinen DNA-Lösung. Reine DNA-Lösung hat einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8. Ein OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,5 würde einer Lösung aus 50% Protein und 50% DNA entsprechen. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.636 f)

In Abbildung 13 sieht man ein repräsentatives Messergebnis einer DNA-Stammlösung am NanoDrop®. Die DNA-Ausbeute von 1211,8 ng/µl bei einem OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,87 ist ein zufrieden stellendes Ergebnis.

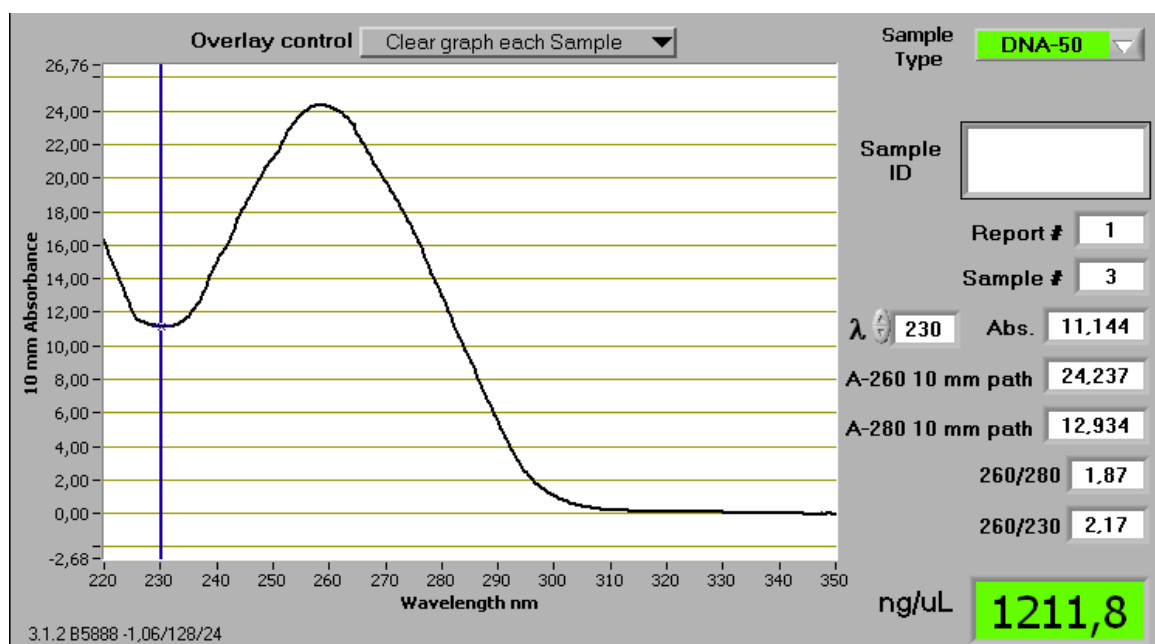


Abbildung 13: Messungsbeispiel einer DNA-Stammlösung am Nanodrop®

Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit ist bei der Messung von RNA folgender Unterschied zu beachten: Im Falle von RNA entspricht ein OD_{260}/OD_{280} -Wert von 2,0 einer reinen Lösung (vgl. Thermo Fisher Scientific, 2008, 5-2). Zugrunde liegt dieser Abweichung die höhere Absorption von Nukleinsäuren, die nicht basengepaart sind. Dieses Phänomen wird als

Hyperchromie bezeichnet. Wie in Abbildung 14 dargestellt kommt es bei einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA zu einer höheren Absorption. Auch bei der als Einzelstrang vorliegenden RNA lässt sich solch ein Hyperchromieeffekt beobachten. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.636 f)

Die bereits vom Gerät durchgeführten Berechnungen erfolgen anhand der nachfolgenden zwei Formeln (vgl. Thermo Fisher Scientific, 2008, 19-2 f):

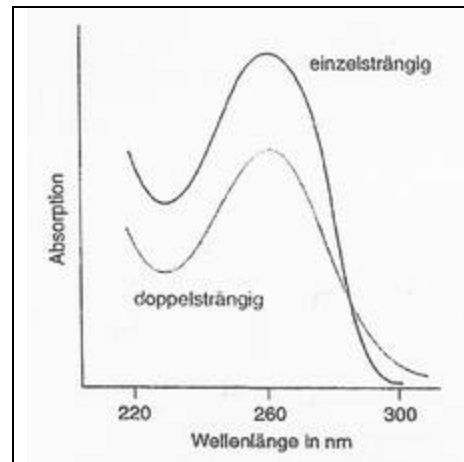


Abbildung 14: Absorptionskurven doppel- und einzelsträngiger DNA
(Lottspeich et Engels, 2006, S.636)

$$A = E \times b \times c$$

A = Absorption in [AU]

E = molarer wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in [l/mol-cm]

b = Pfadlänge in [cm]

c = Konzentration des zu bestimmenden Stoffes [mol/l]

$$c = (A \times e) / b$$

c = Konzentration der Nukleinsäure [ng/μl]

A = Absorption in [AU]

e¹ = wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in [ng-cm/ml]

b² = Pfadlänge [cm]

4.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die 1987 erstmalig von Kary B. Mullis (vgl. Mullis and Faloona, 1987) beschriebene Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; kurz PCR) ermöglicht eine Vermehrung von Nukleinsäuren durch temperaturstabile DNA-Polymerasen *in vitro*. Es wird zunächst der DNA-Doppelstrang bei hohen Temperaturen aufgetrennt (Denaturierung). Hiernach lagern sich zur Zielsequenz komplementäre einzelsträngige einander gegenläufige, in großem Überschuss vorliegende (vgl. Nelson et Cox, 2009, S.425) Oligonukleotide

¹ Die Extinktionskoeffizienten betragen: Doppelstrang-DNA: 50 ng-cm/μl,
Einzelstrang-DNA: 33 ng-cm/μl
RNA: 40 ng-cm/μl

² Die Pfadlänge für Nukleinsäuren beträgt 1 cm.

(engl. *primer*) an den Sense- und Antisense-Strang (engl. *annealing*). Hierfür wird auf eine primerspezifische Temperatur abgekühlt. Nach Erhöhung auf die Temperatur, welche dem Aktivitätsmaximum der verwendeten Polymerase entspricht, kommt es zur Verlängerung des Tochterstranges (engl. *extension*).

Bei dieser enzymatisch katalysierten Reaktion entsteht eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Ende der 2'-Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und der 3'-OH-Gruppe der bestehenden Sequenz unter Pyrophosphatabspaltung (vgl. Renneberg, 2007, S.50). Eine PCR besteht aus vielen Zyklen solcher Denaturierungs-, Annealing- und Exten-

Substanz	µl
PCR-Puffer (15mM MgCl ₂)	5
MgCl ₂ 25 mM Stock Solution	1
dNTP-Mix*	2,5
Vorwärtsprimer (2 µM)	5
Rückwärtsprimer (2 µM)	5
Aqua ad injectabilia	26,3
AmpliTaQ Gold™ (5 U/µl)	0,2
+ DNA	5
Gesamt:	50

Tabelle 1: PCR-Protokoll für Exon 4 und Exon 6

Substanz	µl
PCR-Puffer (15mM MgCl ₂)	5
dNTP-Mix*	2,5
Vorwärtsprimer (2 µM)	5
Rückwärtsprimer (2 µM)	5
Aqua ad injectabilia	27,3
AmpliTaQ Gold™ (5 U/µl)	0,2
+ DNA	5
Gesamt:	50

Tabelle 2: PCR-Protokoll für Exon 2, 10, 11, 13, 14, 22

sionsschritte. Die Amplifikation erfolgt exponentiell, da je Zyklus auch die jeweiligen Tochterstränge als Matrize dienen. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.743 ff)

Die DNA-Templates (10 ng/µl) wurden nach langsamem Auftauen je nach Anzahl entweder in 96-Well Platten oder in 8er

Softstrips pipettiert. Entsprechend Tabelle 1 und Tabelle 2 wurde ein Mastermix erstellt. Das Volumen wurde jeweils mit der Anzahl der Proben multipliziert. Für den 50 µl Gesamtansatz wurden jeweils 45 µl Mastermix zu dem 5 µl DNA-Template hinzugefügt. Die Platte bzw. die Softstrips wurden in den PTC-200 Thermo Cycler der Firma Biorad gestellt und das PCR-Programm gestartet (vgl. Tabelle 3). Zu beachten ist die primerspezifische Annealing-

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Initiale Inkubation	94°C	10:00
Denaturierung	94°C	0:30
Annealing	50 – 57°C	0:30
Extension	72°C	1:00
	72°C	8:00
	10°C	forever

Tabelle 3: Temperaturprofil für die PCR-Reaktion

Temperatur. Die als inaktiviertes Enzym vorliegende AmpliTaQ Gold™ macht

* vgl. 4.5 Lösungen, Puffer und Medien, S.37

Temperatur	Zeit (min)	
94°C	10:00	
95°C	0:30	12x
60°C - 0,4°C pro Zyklus	0:30	
72°C	1:00	
95°C	0:30	35x
50°C	0:30	
72°C	1:00	
72°C	7:00	
8°C	forever	

Tabelle 4: Temperaturprofil des Touchdown-Programms für Intron 10

die initiale Inkubation von 10 min bei 94 -95°C notwendig (vgl. Applied Biosystems, Support/ Techttools, 2011).

Aufgrund der unterschiedlichen Annealing-Temperaturen des Vorwärts- und Rückwärts-Primers „IN 10“ (vgl. 4.6 Primer, S.37) von 54°C bzw. 58°C war für die PCR-Reaktion des Introns 10 die Verwendung des in Tabelle 4 aufgelisteten Touchdown-Programms nötig.

4.11 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem Wave® DNA Fragment Analysis System der Firma Transgenomic auf vorliegende genetische Varianten untersucht.

Das hierbei zugrunde liegende Verfahren, eine Form der Hochleistungsflüssig-

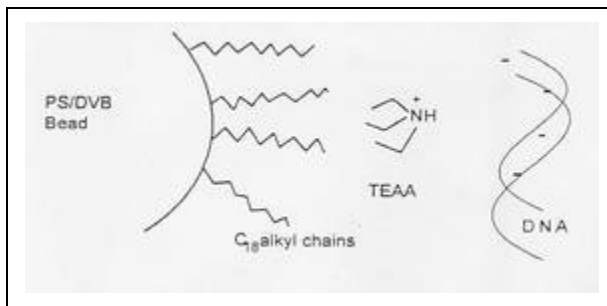


Abbildung 15: Retentionsmechanismus bei der Auftrennung von Doppelstrang-DNA mittels RP-IP HPLC

(Sarasep Inc., General Description: DNASep™)

chromatographie, die *Reverse-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography* (RP-IP HPLC), ist die Schlüsselmethode dieser Arbeit und soll deshalb genauer beschrieben werden. Die DHPLC ermöglicht die Analyse von

großen Probenzahlen in relativ kurzem Zeitraum und macht dadurch den Gedanken an ein

klinisches Screening von Chemopatienten auf SNPs im DPYD-Gen vor Beginn einer 5-FU-haltigen Therapie überhaupt erst möglich.

Bei der zugrunde liegenden Methode wird die DNA-Probe, das PCR-Produkt, voll automatisiert einer 96-Well Platte entnommen und in eine, aus einem Gradienten an Puffer A und Puffer B gebildete, flüssige, mobile Phase eingespritzt. Beide Puffer enthalten Triethylammoniumacetat (TEAA), Puffer B zusätzlich 25% Acetonitril. Die flüssige Phase wird von einer Hochdruckpumpe zur stationären Phase, der DNASep™ Säule befördert (vgl. Sarasep Inc., General Description: DNASep™). Diese beinhaltet nichtporöse Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymere (PS/DVB) (ibd.). Durch C18-Alkylreste auf ihrer Oberfläche erhält man ein unpolares Trägermaterial, die Umkehrphase (*Reverse-Phase*) (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.224). Über das Ionenpaarreagenz TEAA in der flüssigen Phase wird die Interaktion zwischen den negativ geladenen Phosphationen der DNA-Moleküle und der elektrisch neutralen und hydrophoben Säulenmatrix vermittelt (vgl. Abbildung 15). DNA könnte sich ohne ein solches Brückenmolekül nicht an die Säule anlagern. Mit zunehmender Länge eines DNA-Fragments steigt auch deren Anzahl an negativ geladenen Phosphationen, an die das positiv geladene Ammoniumion des TEAA binden kann (vgl. Abbildung 16). Je mehr TEAA-Moleküle ansetzen, umso mehr TEAA-Alkylreste können auf der anderen Seite mit den C18-Alkylresten der Säule interagieren. Somit lagern sich längere DNA-Fragmente stärker an die Säule an, als kürzere. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

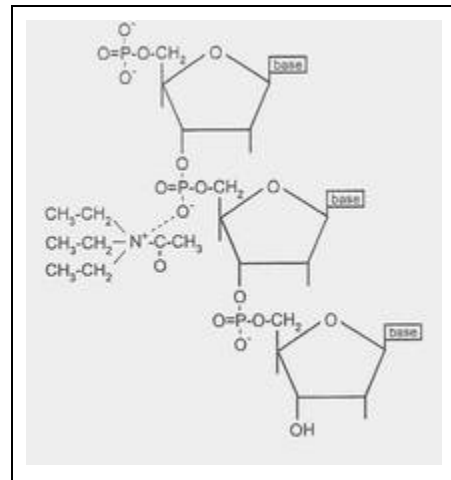


Abbildung 16: Interaktion zwischen TEAA und DNA-Molekülen (Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Die Retentionsstärke ist zudem temperaturabhängig, wobei das Maximum bei 50°C liegt. Huber et al. vermuten, dass dies auf die Auffaltung und Entspiralisierung der DNA-Helix zurückzuführen ist, wodurch weitere Phosphatgruppen für Ionenpaarungen zur Verfügung stünden (vgl. Huber, Oefner et al., 1993).

Dem Gradienten wird nach und nach ein größerer Anteil an Puffer B zugeführt, wodurch es zur Elution der DNA-Fragmente von der Säule kommt. Mit steigender Konzentration des organischen und somit unpolaren Lösungsmittels

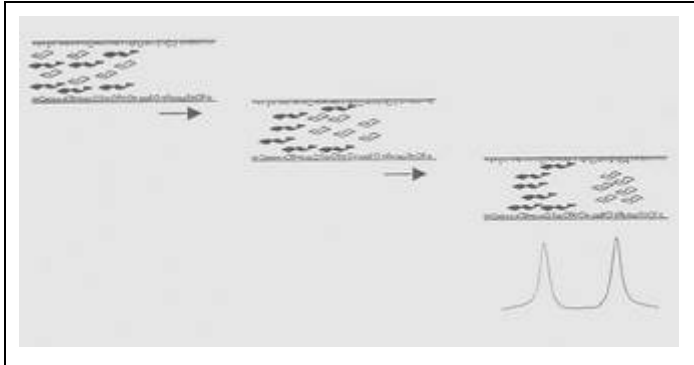


Abbildung 17: Unterschiedliche Elutionsgeschwindigkeit zwischen DNA-Fragmenten verschiedener Länge

(Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Acetonitril sinkt die Polarität der flüssigen Phase zunehmend (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.224). Hierdurch vermindert sich die hydrophobe Interaktion zwischen den Alkylresten der stationären Phase und denen der flüssigen Phase, wodurch die Elutionskraft steigt. Da längere DNA-Fragmente stärker haften, werden sie nun auch später als die kürzeren von der Säule eluiert (vgl. Abbildung 17). Hierdurch ergibt sich eine größenabhängige Auftrennung der DNA-Fragmente. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Die DNA wird mit der flüssigen Phase weiter zum UV-Detektor transportiert. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm (vgl. Transgenomic, Application Note 110). Das analoge Signal wird in einen digitalen Messwert umgewandelt. Die Abfolge solcher Messpeaks resultiert als sogenanntes Chromatogramm, dessen Muster Rückschlüsse auf die DNA-Fragmente erlaubt. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Im Gegensatz zu der eben beschriebenen größenabhängigen Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente, nutzt das WAVE® System zur Detektierung genetischer Varianten eine sequenzabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten. Hierzu sind denaturierende Bedingungen erforderlich. Die Analyse wird mittels DHPLC (engl. *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) durchgeführt. (vgl. An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Um genetische Varianten erkennen zu können, muss vor der eigentlichen Analyse mit dem Wave[®] System zunächst ein weiteres Programm am Thermocycler laufen. In Individuen, die heterozygot für einen Einzelnukleotid-Polymorphismus bzw. eine Einzelnukleotid-Mutation sind, liegt die mutierte DNA zur Wildtyp-DNA in einem Verhältnis von 1 zu 1 vor. Ein Erhitzen der DNA auf 95°C und ein anschließendes langsames Abkühlen führt zu einer Rehybridisierung der Einzelstränge (vgl. Transgenomic, Application Note 112). Es entsteht eine Mischung aus Hetero- und Homoduplexen. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE[®] DNA Fragment Analysis System)

Sobald die DNA von Individuen analysiert wird, die homozygot für eine bestimmte Mutation sind, wird das Vorgehen geringfügig geändert. Das Vorliegen von derselben Punktmutation auf beiden Allelen macht das Mischen mit Wildtyp-DNA vor dem Erhitzen notwendig, um wiederum Heteroduplexe zu erhalten. Wie Abbildung 18 zeigt, entstehen auch hier sowohl Hetero- als auch Homo-

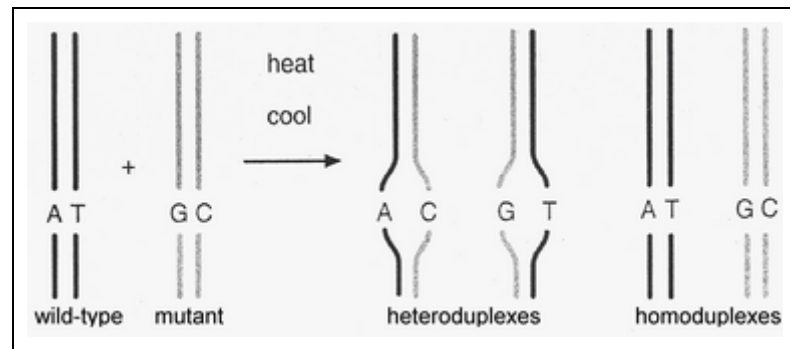


Abbildung 18: Heteroduplexbildung durch Hybridisierung

(nach: Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE[®] DNA Fragment Analysis System)

duplexe - jeweils zwei Subtypen, insgesamt 4 verschiedene Duplexe. Um die Bildung von Heteroduplexen zu optimieren, sollten äquivalente molare Mengen an Wildtyp- und homozygoter Proben-DNA gemischt werden. (ibd.)

Die Analyse am Wave[®] System erfolgt bei einer Temperatur, die hoch genug ist, um die DNA-Heteroduplexe teilweise aufzuschmelzen. Diese denaturierten Heteroduplexe werden nun mittels RP-IP HPLC von den korrespondierenden Homoduplexen getrennt. Die Trennung von Hetero- und Homoduplexen erfolgt aufgrund der geringeren negativen Ladung von Einzelstrang-DNA. Heteroduplexe liegen bei denaturierenden Temperaturen partiell, an der fehlgepaarten Base und um sie herum, als Einzelstrang vor. Die geringere negative Ladung führt dazu, dass die Heteroduplexmoleküle weniger stark von der Säule zurückgehalten werden, früher eluieren und somit vor den, noch intakten

Homoduplexen am Detektor auftauchen. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Wie abhängig dieser Vorgang von der Temperatur ist, zeigt Abbildung 19. Unter den nicht-denaturierenden Temperaturen von 51°C und 52°C haben alle vier

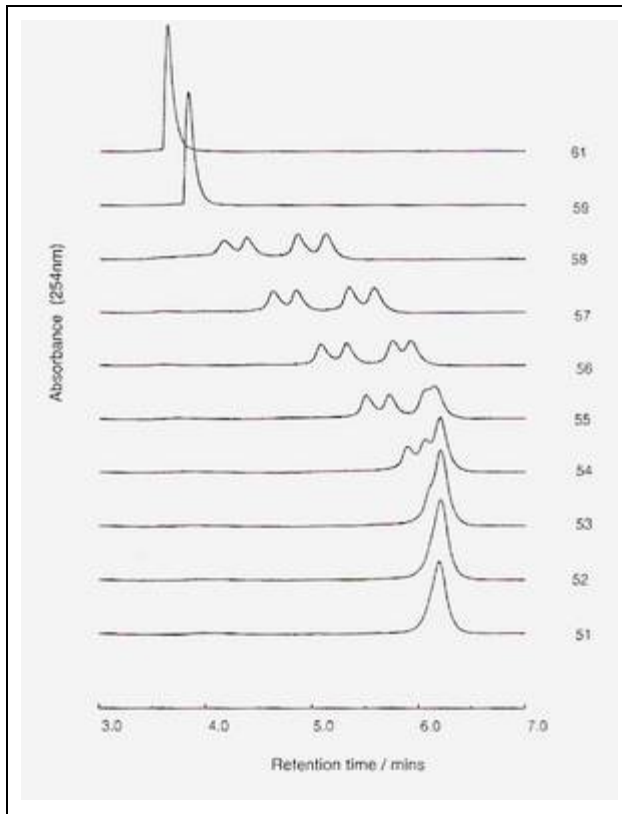


Abbildung 19: Der Effekt von unterschiedlichen Temperaturen auf die Differenzierung von Homo- und Heteroduplexen

(Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Homoduplexen zu unterscheiden. Bei 55°C lassen sich nun auch die beiden Homoduplexvarianten voneinander abgrenzen, da der A-T-Wildtyphomoduplex geringfügig stärker denaturiert, als der mutierte C-G-Homoduplex. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Eine komplette Differenzierung zwischen den beiden Homoduplexvarianten ist nicht immer bei allen Sequenzen möglich. Dies ist jedoch auch gar nicht erforderlich, schließlich bietet bereits eine Abweichung von der mitgelaufenen Wildtypkontrolle genug Evidenz für die Annahme einer Sequenzvariation. Auch eine Unterscheidung zwischen den beiden verschiedenen Heteroduplexvarianten ist

der möglichen Hybridisierungsvarianten aus Abbildung 18 dieselbe Retentionszeit und sind nicht zu unterscheiden, da sie nur einen Peak bilden. So wird auch z.B. die Temperatur von 50°C für die Größenbestimmung bzw. Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe verwendet. Im Gegensatz zur sequenzunabhängigen Trennung nach Größe, erfolgt die sequenzspezifische Detektion von Mutationen oder Polymorphismen erst in Temperaturbereichen, in denen es zu einer Denaturierung kommt. Mit der partiellen Denaturierung ab einer Temperatur von 54°C beginnen sich die Heteroduplexe des dargestellten PCR-Produkts von den

nicht immer möglich. In den meisten Fällen sieht man nur zwei Einzelpeaks (vgl. Abbildung 20), repräsentativ für die Hetero- bzw. die Homoduplexfraktion. Neben dem Fall von eindeutig voneinander getrennten Einzelpeaks, ist auch eine nur minimale Abweichung vom Wildtyp-Peak, eine Schulter an der aufsteigenden Seite, denkbar (vgl. Transgenomic, Application Note 112). Die ideale Auflösung zwischen Homo- und Heteroduplexen erfolgt, in Form zweier eindeutiger Doppelpeaks, am Beispiel aus Abbildung 19 bei 56°C. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

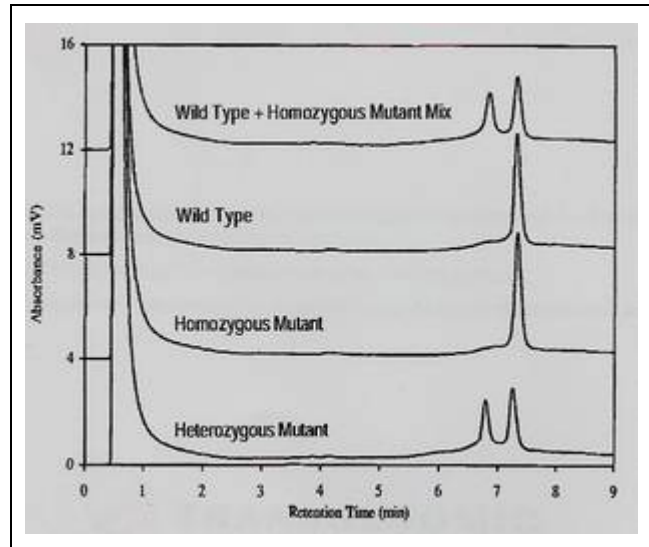


Abbildung 20: Teilweise denaturierende Detektion mit dem WAVE® System von SNPs in einem 185bp Fragment

(Transgenomic, Application Note 112, 2000)

Zu hohe Temperaturen wären hingegen 59°C und 61°C (vgl.

Abbildung 19). Hier kommt es neben der gewünschten partiellen Denaturierung der Heteroduplexe, zusätzlich zu deren kompletten Aufschmelzung. Auch die Homoduplexe denaturieren bei diesen Temperaturen vollständig. Eine

Temperatur	Zeit (min)	
95°C	5:00	
95°C - 0,1°C pro Zyklus	0:06	300x
65°C	1:00	
10°C	forever	

Tabelle 5: Temperaturprofil des HET-Programms für die Hybridisierungsreaktion

Differenzierung zwischen den beiden ist dann nicht mehr möglich, da die DNA-Moleküle nun als Einzelstränge vorliegen. Es gibt wiederum nur einen Peak, früher als im unteren Temperaturbereich, da die geringere negative Ladung der durch Denaturierung entstandenen Einzelstränge im Vergleich zu den Doppelsträngen zu einer schnelleren Elution führt. (vgl. Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE® DNA Fragment Analysis System)

Die angesprochene Rehybridisierung (vgl. Abbildung 18) nach PCR, vor der DHPLC-Analyse, wurde nach dem Temperaturprofil in Tabelle 5 auf dem PTC-200 Thermo Cycler der Firma Biorad durchgeführt. Um homozygote Varianten

zu detektieren, wurden dazu jeweils 10 µl des 50 µl PCR-Ansatzes dreier unbekannter Proben miteinander gepoolt und anschließend hybridisiert. Als Kontrollen wurden bereits bekannte genetische Varianten aus vorherigen internen Arbeiten verwendet.

4.12 Gelelektrophorese

Sowohl die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, als auch deren Identifizierung nach erfolgter PCR vor weiterführenden Versuchen, wie z.B. der Cycle-Sequencing Reaktion, erfolgte mittels Gelelektrophorese. Als Trägermaterial wurden Agarosegele verwendet, abhängig von der erwarteten Basenlänge des PCR-Produktes von ca. 250 – 450 bp zumeist 1,5%ig. Hierfür wurden 4,5 g Agarose-Pulver abgewogen und auf 300 ml TBE-Puffer gebracht. Nach der Erhitzung in der Mikrowelle wurden zunächst 7 - 10 µl Ethidiumbromid zugegeben, anschließend wurde das Gel gegossen.

Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. 5 µl PCR-Produkt wurden zur Beschwerung jeweils mit 5 µl Ficoll-Ladepuffer vermischt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Die DNA-Fragmente wurden bei 120 V zwischen 15 - 25 min aufgetrennt. Als Längenstandard lief parallel die 100 bp DNA-Leiter. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte über UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm. Es folgte die Abfotografierung mit dem Fotografiergerät UV-Solo der Firma Biometra.

Das Prinzip der Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese beruht auf der negativen Ladung der Nukleinsäuren, die durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen im Rückgrat zustande kommt und weitgehend unabhängig vom pH-Wert ist. Im elektrischen Feld wandern die Nukleinsäuren zur Anode, je nach Molekülgröße schneller oder langsamer. DNA-Fragmente kleinerer Molekülgrößen werden von den Poren der Agarosegelmatrix kaum gebremst und wandern pro Zeiteinheit weiter als DNA-Fragmente mit höherer Molekülgröße. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.663 ff)

Die Eigenfluoreszenz der DNA wird durch das Ethidiumbromid verstärkt. Hierbei handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, dessen aromatische Ringe mit den Ringen der Nukleinsäurebasen interagieren. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.679)

4.13 Aufreinigen des PCR-Produktes

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte, z.B. vor einer *Cycle-Sequencing* Reaktion, wurde das jeweilige PCR-Gemisch (50 µl) zusammen mit 250 µl H₂O in ein *Well* einer Vakuumplatte der Firma Millipore pipettiert. Über das Anlegen eines Vakuums von 15 – 30 bar durch eine Pumpe werden sowohl das Wasser, als auch später störende Überreste der vorausgegangenen PCR-Reaktion, wie z.B. nicht verbrauchte Nukleotide oder Primer, nach unten hin abgesaugt, wohingegen das nun gereinigte PCR-Produkt auf einer besonderen Membran verbleibt. Anschließend wurden je 30 µl H₂O hinzugefügt. Die so aufgereinigten PCR-Produkte konnten nun wieder in entsprechende Tubes pipettiert werden.

4.14 Cycle-Sequencing Reaktion

Das Prinzip der durchgeführten *Cycle-Sequencing* Reaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren, auch Didesoxyverfahren bzw. Terminationsverfahren, nach Sanger (vgl. Sanger, Nicklen et al., 1977). Hierbei wird zuerst aus der ursprünglichen Startsequenz, dem gereinigten PCR-Produkt, durch Zugabe eines Nukleotidgemisches, sowie einer DNA-Polymerase und dem Vorwärts- oder Rückwärtsprimer ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Das Nukleotidgemisch enthält einerseits die regulären vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), sowie einen festgelegten, kleineren Anteil an 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs), den sogenannten Terminatoren (vgl. Abbildung 21).

Durch die fehlende 3'-OH-Gruppe kommt es bei der Kondensationsreaktion von ddNTPs mit dem DNA-Strang zu einem Kettenabbruch. Das Mischverhältnis an dNTPs und ddNTPs sorgt dabei dafür, dass am Ende genügend Reaktionsprodukte vorhanden sind, die sich jeweils nur um eine Basenlänge unterscheiden. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.777 ff)

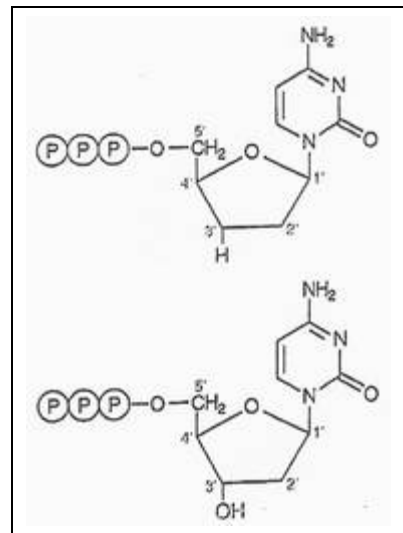


Abbildung 21: Strukturvergleich eines 2',3'-Dideoxynukleotids und eines 2'-Desoxynukleotids

(Lottspeich et Engels, 2006, S.781)

In dem für die Cycle-Sequencing Reaktion verwendeten BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Firma Applied Biosystems) enthalten die vier

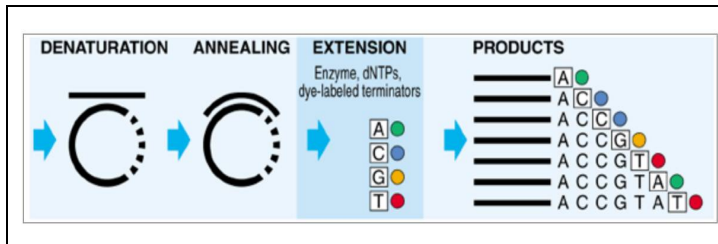


Abbildung 22: Die Dye Terminator Cycle-Sequencing Reaktion

(Applied Biosystems/ Sequencing Chemistries, 2011)

ddNTPs unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe. Dadurch, dass jedes ddNTP fluoreszenzmarkiert ist, kann später immer jeweils die letzte Base der einzelnen Fragmente identifiziert werden (vgl. Abbildung 22).

Die Terminationsfragmente können durch ihre unterschiedlichen Längen durch den vollautomatischen Kapillarelektrophorese-Sequencer ABI PRISM 3130 (Firma Applied Biosystems) aufgetrennt werden. Die anschließend im Laserstrahl zum Fluoreszieren angeregten Farbstoffe werden durch einen optischen Detektor registriert und anschließend über die Data Collection Software in ein digitales Signal umgewandelt (vgl. Abbildung 23). Durch die, bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszierenden Farbstoffe der Terminator-Didesoxynukleotide kann so die genaue Basenabfolge nach Auswertung mit der Sequencing Analysis Software v5.3.1 dargestellt werden. (vgl. Applied Biosystems, Electrophoresis, 2011; Applied Biosystems, Sequencing Chemistries, 2011)

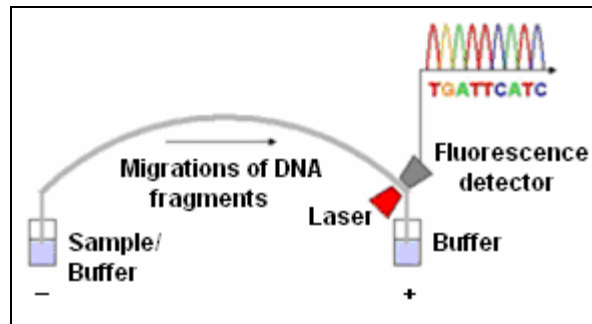


Abbildung 23: Übersicht zur Sequenzierreaktion

(nach: Applied Biosystems, Electrophoresis, 2011)

Schritt	Temperatur	Zeit (min)	
Denaturierung	95°C	0:30	27x
Annealing	50°C	0:15	
Extension	60°C	4:00	
	10°C	10:00	

Tabelle 6: Temperaturprofil für die Cycle-Sequencing-Reaktion

sowie 0,2 µl entweder Vorwärts- oder Rückwärtsprimer zusammen pipettiert. Der Ansatz wurde gegebenenfalls mit Aqua ad injectabilia auf ein Gesamtvolumen von 9,7 µl gebracht. Die Reaktion erfolgte mit dem PTC-200 Thermo

Cycler der Firma Biorad nach dem Temperaturprofil aus Tabelle 6. Im Anschluss erfolgte eine DNA-Fällung mit 30 µl 100%igem Alkohol. Nach Zentrifugation über 30 min bei 3000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl 70%igem Alkohol durch erneute Zentrifugation bei 3000 g über 10 min gewaschen. Nach 10 - 15 minütiger Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Sequenzierprodukt in 100 µl Aqua ad injectabilia gelöst, wovon 2 – 5 µl, je nach Stärke des ursprünglichen PCR-Produktes, in die entsprechende 96-Well Platte für den ABI PRISM 3130 pipettiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht wurden.

4.15 RNA-Isolierung aus Vollblut

Die RNA-Präparation wurde mit dem PAXgene™ Blood RNA Kit der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Abnahme und den anschließenden Versand der Probe wurde das PAXgene™ Blood RNA Tube verwendet, wodurch die intrazelluläre RNA trotz Temperaturen von 18 – 25°C über drei Tage hinweg vor dem Abbau durch RNAsen sowie vor *ex vivo* Veränderungen der Genexpression geschützt und somit haltbar bleibt (vgl. Preanalytix GmbH, 2008, S.11). Das Blut konnte in diesen speziellen Röhrchen ungekühlt versendet werden. Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem in Abbildung 24 schematisch dargestellten Prinzip.

Vor Verarbeitung sollte der ausreichenden Lyse wegen das PAXgene™ Blood RNA Tube für mind. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Als erster Schritt wurde das Röhrchen

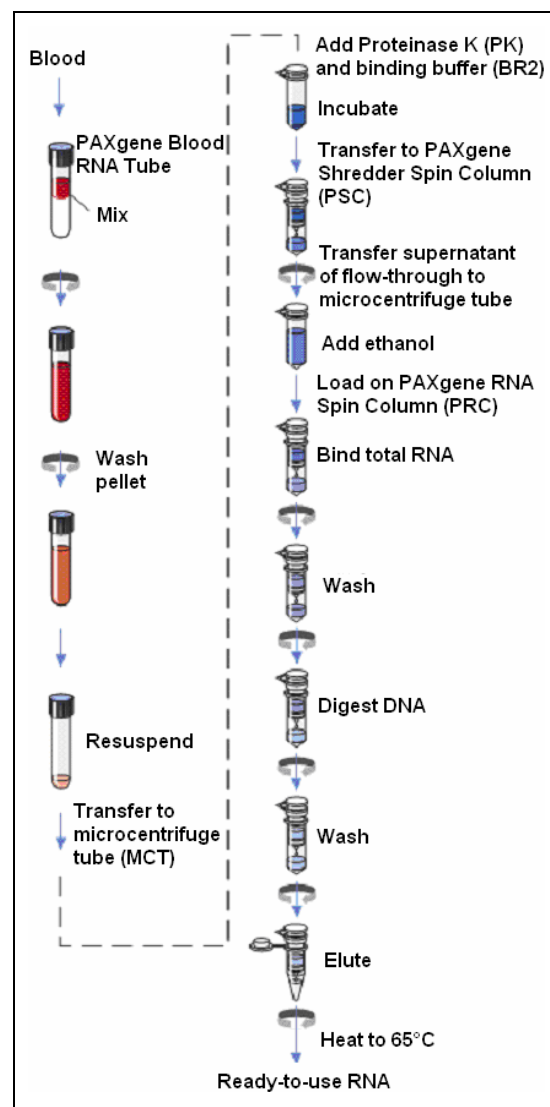


Abbildung 24: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung mit dem PAXgene™ Blood RNA Kit und Tube

(nach: Preanalytix GmbH, 2008, S.16)

zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfung des Überstandes mit 4 ml RNase-freiem Wasser gewaschen und solange mit dem Vortexer geschüttelt, bis es sich sichtbar aufgelöst hatte. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig verworfen. Das mit Puffer resuspendierte Pellet wurde nach Überführung in ein spezielles, im Kit enthaltenes 1,5 ml Tube durch Inkubation und Zugabe von Proteinase K und Bindungspuffer einem Protein-Verdau unterzogen. Anschließend wurde das Zellysate durch die „PAXgene Shredder Spin Column“, einer speziellen Säule, hindurch zentrifugiert. Dadurch kam es zur Homogenisierung des Lysates und zur Entfernung übriggebliebener Zelltrümmer. Die Durchflussfraktion wurde in ein neues Tube überführt. Ethanol wurde zur Einstellung der Bindebedingungen hinzugefügt. Das Lysat wurde in die „PAXgene RNA Spin Column“ gegeben. Diese enthält eine spezielle Membran, an die RNA während der nachfolgenden Durchzentrifugierung spezifisch bindet, wohingegen alle übrigen Bestandteile größtenteils ungehindert durchfließen. Restliche Verunreinigungen wurden in mehreren nachfolgenden Waschschritten entfernt. Zwischen dem ersten und dem zweiten Waschschriff wurde die Membran mit DNase behandelt, um Spuren von gebundener DNA zu entfernen. Nach den Waschschriffen wurde die RNA mit „Elution Buffer“ von der Membran gelöst. Anschließend wurde das Eluat bei 65°C denaturiert. (vgl. Preanalytix GmbH, 2008, S.18)

4.16 Amplifikation von mRNA durch RT-PCR

Die Vermehrung der, in der zuvor isolierten Gesamt-RNA zu ca. 2% enthaltenen mRNA (vgl. Mülhardt, 2009, S.125) erfolgte mittels RT-PCR. Diese wurde in zwei Schritten durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Reverse Transkription (RT), in dem die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben wurde (vgl. Clark et Pazdernik, 2009, S.113). Anschließend wurde entstandene cDNA in einer konventionellen PCR mit Taq-Polymerase vervielfältigt. Vorteil dieses zweizeitigen Vorgehens ist die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase. Das erneute Umpipettieren birgt im Vergleich zur einzeitigen RT-PCR jedoch die Gefahr von Kontaminationen. (vgl. Lottspeich et Engels, 2006, S.749 f)

Substanz	Ansatz 1	Ansatz 2
10 x Reaction Buffer	2 µl	2 µl
MgCl ₂ 25 mM Stock Solution	4 µl	4 µl
Deoxynucleotide Mix (10mM)	2 µl	2 µl
Random Primer	2 µl	-----
Spezifische Primer for	-----	1 µl
(10 µM) rev	-----	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl	1 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,8 µl	0,8 µl
Aqua ad injectabilia	8,2 µl	8,2 µl
	minus	minus
	Volumen	Volumen
	der RNA	der RNA
+ RNA	1 µg*	1 µg*
Gesamt	20 µl	20 µl

Tabelle 7: Pipettierschema für die Reverse Transkription

*berechnet anhand vorheriger Messung mit dem Nanodrop® (vgl. Kapitel 4.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren, S.40)

Ansatz 2 erfolgte mit sequenzspezifischen Primern, die an eine gewünschte spezifische Stelle der RNA binden.

Für die Reverse Transkription kam das First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR der Firma Roche zum Einsatz. Die

in Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien stammen größtenteils aus dem genannten Kit. Das Temperaturprofil für die mit dem PTC-200 Thermo Cycler der Firma Biorad durchgeführte Reverse Transkription, kann Tabelle 8 entnommen werden.

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Annealing	25°C	10:00
Reverse Transkription	42°C	60:00
Denaturierung	99°C	5:00
	4°	forever

Tabelle 8: Temperaturprofil für die Reverse Transkription

Die sich anschließende PCR zur Vervielfältigung der gewonnenen cDNA erfolgte nach dem Pipettierschema in Tabelle 9 und dem Temperaturprofil aus Tabelle 10.

Substanz	µl
PCR-Puffer (15mM MgCl ₂)	5
dNTP-Mix*	5
Spezifische Primer for	2,5
(10 µM) rev	2,5
Aqua ad injectabilia	29,8
AmpliTaq Gold™ (5 U/µl)	0,2
+ cDNA-Produkt	5
Gesamt:	50

Tabelle 9: Pipettierschema für die der Reversen Trankription folgenden PCR

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
Initiale Inkubation	94°C	10:00
Denaturierung	94°C	0:30
Annealing	57°C	1:00
Extension	72°C	2:00
	72°C	8:00
	10°C	forever

Tabelle 10: Temperaturprofil für die der Reversen Transkription folgenden PCR

Die Reverse Transkription erfolgte nach zwei Ansätzen (vgl. Tabelle 7):

Im Ansatz 1 kamen so genannte *Random* Primer zum Einsatz. Es handelt sich hierbei um ein Hexanukleotidgemisch aus verschiedenen Sequenzen, deren zufällige Bindung an die RNA zu einem Pool an cDNAs unterschiedlicher Länge führt (vgl. Lottspeich et Engels,

4.17 Statistische Auswertung

Die Erstellung von Kreuztabellen für die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms PASW Statistics 18. Die weitere Berechnung wurde in Absprache mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar wie folgt vorgenommen. Zur Zuordnung der Bezeichnungen diente Tabelle 11.

Die Odds Ratios wurden mit folgender Formel berechnet:

$$OR = (a \times d) / (b \times c)$$

Für die Berechnung der Konfidenzintervalle und p-Werte wurde zunächst die T-Statistik mit folgender Formel ermittelt:

$$T = (p_+ - p_-) / \sqrt{p \times (1 - p) \times (1/n_+ + 1/n_-)}$$

p_+ , p_- und p wurden folgendermaßen berechnet:

$$p_+ = a/n_+$$

$$p_- = b/n_-$$

$$p = (a+b)/n$$

	K ⁺	K ⁻	Σ
F ⁺	a	b	a+b
F ⁻	c	d	c+d
Σ	n ₊	n ₋	n

Tabelle 11: Bezeichnungszuordnung für die Berechnung der T-Statistik

Aus T-Statistik und Odds Ratio ergibt sich das Konfidenzintervall:

$$KI: OR^{1 \pm 1,96/T}$$

Die Berechnung des p-Wertes aus der, auf die zweite Dezimalstelle gerundeten T-Statistik erfolgte mit nachfolgender Formel unter zu Hilfenahme einer Normalverteilungstabelle.

$$p = 1 - | 2 \times FT(x) - 1 |$$

5. Ergebnisse

5.1 Rekrutierung des Patientenkollektivs

Es wurde mit dem Einschlusskriterium einer 5-FU-haltigen Chemotherapie (inkl. Capecitabine) unabhängig von der vorliegenden Grunderkrankung ein Patientenkollektiv zusammengestellt. Die Daten wurden retrospektiv unter Akten- bzw. SAP-Einsicht ausgewertet. Falls notwendig, wurden die Chemotherapie fortführenden Onkologen befragt oder entsprechende Arztbriefe angefordert.

Folgende Daten wurden erhoben:

- Alter
- Geschlecht
- Tumorentität
- Chemotherapieschema
- 5-FU-Dosis in mg/m^2
- Zyklusanzahl
- „ECOG“ (vgl. Anhang)
- Nebenwirkungen (Blutbildveränderung, gastrointestinale Veränderungen, Hand-Fuß-Syndrom, Hautreaktionen, Lebertoxizität, Alopezie, Neuro-pathie) (vgl. Anhang)

Die Zusammenstellung des Patientenkollektivs baute auf ein in der Arbeitsgruppe vorliegendes Kollektiv ($n = 139$) mit bereits vorliegenden Analysen hinsichtlich c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A auf, welches durch Gross et al. 2008 teilweise veröffentlicht wurde (vgl. Gross, Busse et al., 2008). Im Falle von Unvollständigkeit hinsichtlich der oben aufgeführten Daten, wurde auch hier zur Vervollständigung Datenrecherche betrieben.

Dieses Patientenkollektiv wurde für eine größere Fallzahl folgendermaßen erweitert:

Einerseits wurden tief gefrorene, aus der III. medizinischen Klinik (Hämatologie und Onkologie) stammende Blutproben verwendet, sowie DNA-Proben aus der Frauenklinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isars. Sowohl die Blutproben, als auch die DNA stammen aus den Jahren 2001 – 2004 und wurden

damals für wissenschaftliche Zwecke mit Zustimmung der Patienten/-innen gewonnen und anschließend gelagert. Zu einem geringen Maße wurde zudem über die DNA-Datenbank der Frauenklinik passende Patienten-DNA ausgewählt, welche aus dem Jahr 2008 stammt.

Andererseits wurde von April bis Dezember 2010 in der Chemoeinheit und Tagesklinik der III. medizinischen Klinik, sowie in der Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar, Chemopatienten/-innen Blut abgenommen.

Zusätzlich wurde bei einigen Fällen von im Zeitraum der Datenerhebung bereits aufgetretener Toxizität das Patientenblut durch die behandelnden Ärzte mit der Bitte nach diagnostischer Abklärung an uns weitergeleitet. Solch eine Zusammenarbeit fand mit der Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar München, sowie mit der onkologischen Abteilung des Klinikums Freising statt.

Die venöse Blutentnahme erfolgte nach schriftlicher Einwilligung durch den/die Patienten/-in, peripher am Handrücken oder in der Ellenbeuge bzw. über einen liegenden zentralvenösen Katheter. Das Blut wurde in den kliniküblichen EDTA-Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Von den teilnehmenden Patienten/-innen wurde zwischen Herbst 2008 und Winter 2010 zunächst DNA aus Vollblut isoliert. Anschließend wurde mittels DHPLC der Genotyp bezüglich c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G im DPYD-Gen ermittelt. In einigen wenigen Fällen zur Bestätigung oder bei unbekanntem Varianten bzw. DHPLC-Mustern wurden die Proben zusätzlich sequenziert. Fälle von bereits aufgetretener Toxizität wurden ausgiebiger auf vorhandene genetische Variationen untersucht.

Das vorbestehende Patientenkollektiv (siehe oben) konnte so um 184 Patienten erweitert werden. Anhand der insgesamt 323 Patienten wurden die Berechnungen durchgeführt (siehe unten).

5.2 Unterteilung des Patientenkollektivs

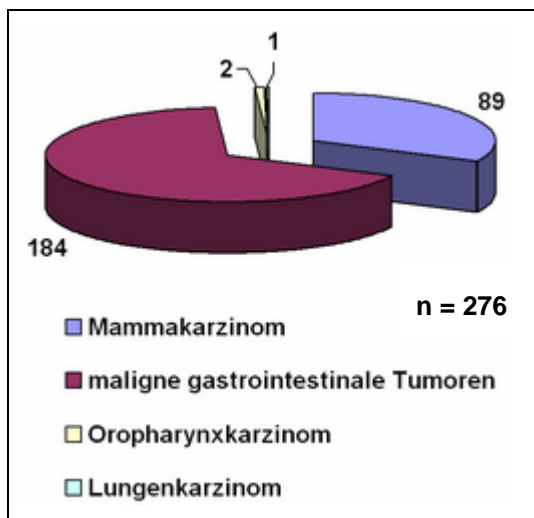


Abbildung 25: Verteilung des Patientenkollektivs auf die Tumorgruppen

Von ursprünglichen 323 Patienten/-innen mit maligner Grunderkrankung wurden 47 nicht gewertet. Hierzu führten zum einen Gründe wie eine doch auswärtig durchgeführte Chemotherapie mit mangelndem *Follow up*, zum anderen nicht verwertbare Blut- bzw. DNA-Proben. Zu einem Ausschluss führte zudem eine vorzeitige Beendigung der Chemotherapie aus anderen Gründen als aufgetretene Nebenwirkungen. Nicht gewertet wurden außerdem Patienten mit einer

Dosisreduktion während der Chemotherapie aufgrund von Nebenwirkungen geringer als °III oder °IV. Dies erfolgte unter der Annahme, dass unter fortgeführter Therapie mit ursprünglicher Dosis Nebenwirkungen °III oder °IV hätten auftreten können und diese Patienten/-innen dann fälschlicherweise der Gruppe mit leichter oder fehlender Toxizität zugeordnet worden wären. Daten zu Patienten/-innen mit einer initialen Dosisreduktion aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes oder wegen hohen Alters wurden im Gegensatz dazu gewertet. Eine Reduktion in diesen Fällen erfolgte auf 80 – 85% der eigentlich üblichen Dosis.

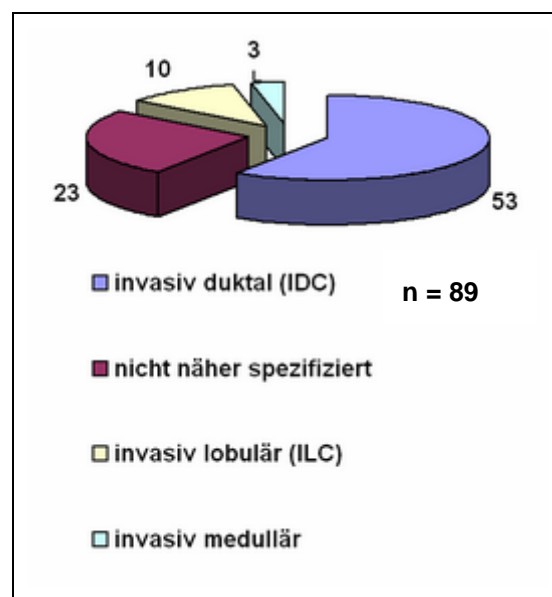


Abbildung 26: Verteilung auf die Tumorsubtypen in der Gruppe mit Mammakarzinom

Die 276 übrigen Patienten/-innen waren an malignen Prozessen der Mamma,

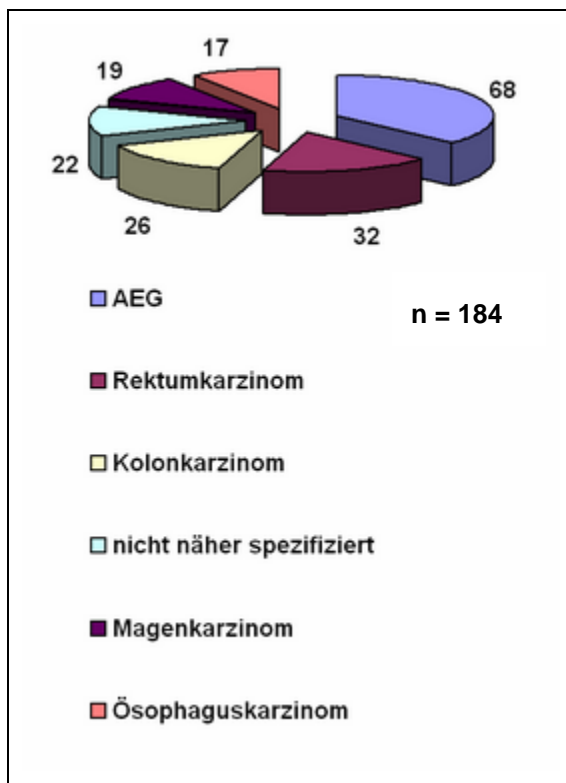


Abbildung 27: Verteilung auf die Tumorsubtypen in der Gruppe mit malignen gastrointestinalen Tumoren

im Gastrointestinaltrakt, im Oropharynx, sowie an der Lunge erkrankt. Die Absolutzahlen können der Abbildung 25 entnommen werden.

Da eine Chemotherapie mit 5-FU je nach Tumor sehr unterschiedlichen Therapieplänen folgt und somit Nebenwirkungen sehr inhomogen sein können, war eine Unterteilung in Subtypen entsprechend Tumorart sinnvoll. Da sich die Tumoren hauptsächlich auf die zwei Entitäten „Mammakarzinom“ und „maligne gastrointestinale Tumoren“ mit 89 bzw. 184 beinhalteten Patienten verteilten, lag für die spätere statistische Auswertung eine Einteilung in

diese zwei großen Gruppen nahe. Bis auf zwei Personen mit Oropharynxkarzinom und einer Person mit Lungenkarzinom sind mit dieser Aufteilung alle Patienten/-innen berücksichtigt. Eine zusätzliche Aufschlüsselung in diesen bei-

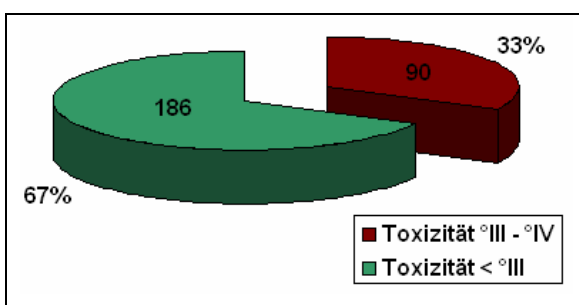


Abbildung 28: Patientenverteilung in nebenwirkungsarme vs. nebenwirkungsreiche Gruppe

den Gruppen anhand der Tumorsubtypen ist für die Mammakarzinome in Abbildung 26 und für die malignen gastrointestinalen Tumoren in Abbildung 27 graphisch dargestellt.

Das Patientenkollektiv wurde nach erfolgter 5-FU-haltiger Chemotherapie anhand des Nebenwirkungsprofils entsprechend der „ECOG Common Toxicity Criteria“ (vgl. Anhang) in zwei Gruppen eingeteilt. Personen ohne oder mit leichten Nebenwirkungen $^{\circ}I$ oder $^{\circ}II$ wurden der Referenzgruppe, diejenigen mit starken Nebenwirkungen ($^{\circ}III$ oder $^{\circ}IV$) der Nebenwirkungsgruppe zugeteilt. Die resultierende Gruppe „leichte/keine Toxizität“ umfasst 186, die Gruppe

„Toxizität °III - °IV“ 90 Patienten (vgl. Abbildung 28). Die in die beiden Gruppen einfließenden Tumorentitäten mit Absolutzahlen sind in Abbildung 29 aufgeführt.

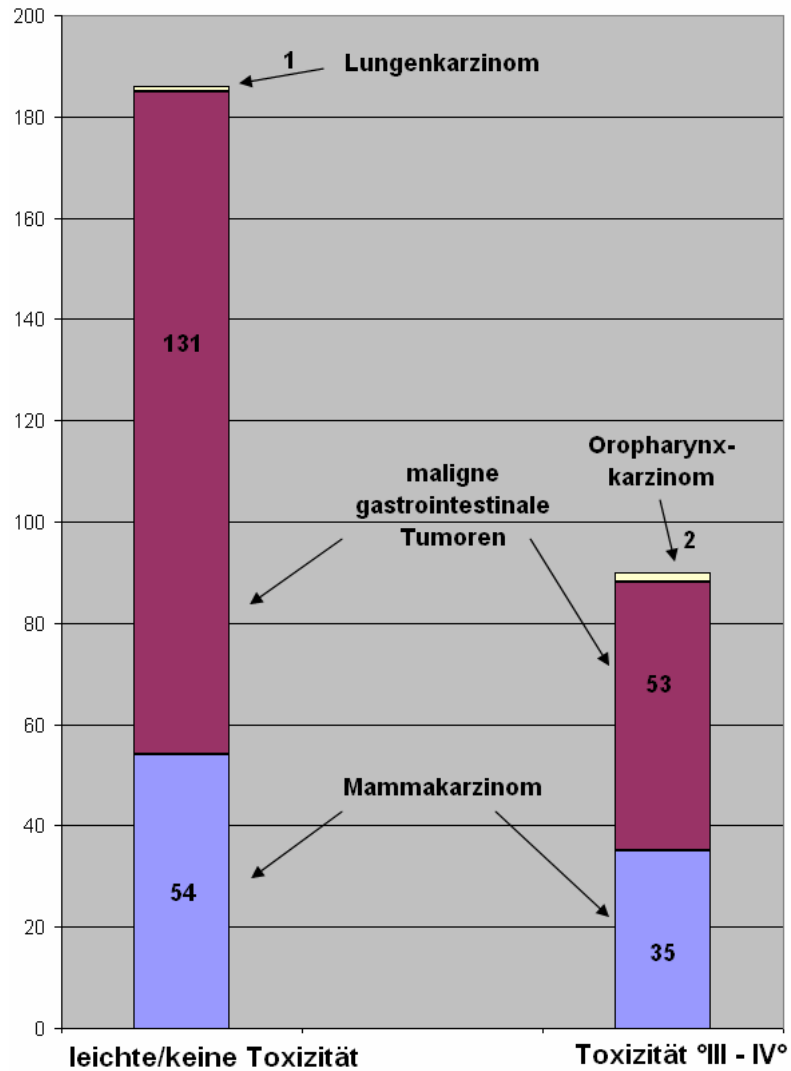


Abbildung 29: Tumorentitäten in den beiden Patientengruppen „leichte/keine Toxizität“ und „Toxizität °III – °IV“

5.3 Eigenschaften des Patientenkollektivs

Die Eigenschaften „Geschlecht, Alter, Tumortyp“ im Patientenkollektiv sind in Tabelle 12 dargestellt. Die jeweiligen Fallzahlen werden entsprechend dem Auftreten von Nebenwirkungen in zwei Spalten gegenüber gestellt.

Es fällt auf, dass die Geschlechterverteilung in der nebenwirkungsarmen Gruppe ausgeglichen ist, wohingegen unter den Personen mit schwerer Toxi-

	leichte/keine Toxizität n = 186	Toxizität °III - °IV n = 90
GESCHLECHT		
Frauen	92	56
Männer	93	34
Unbekannt	1	0
ALTER		
Alter Ø (Jahre ± SD)	58,5 ± 10,48	59,4 ± 10,53
TUMORTYP		
Gastrointestinale Tumoren	131	53
Alter Ø (Jahre ± SD)	59,3 ± 10,96	60,7 ± 8,71
Gastroösophageale Tumoren	95	28
AEG	54	14
Magenkarzinom	14	5
Magenstumpf-CA	1	0
Ösophagus-CA	15	2
nicht näher spezifiziert	11	7
Kolorektale Tumoren	34	24
Kolonkarzinom	15	11
Rektumkarzinom	19	13
Sonstige	2	1
Gallengangs-CA	0	1
Analkanalkarzinom	1	0
nicht näher spezifiziert	1	0
Mammakarzinom	54	35
Alter Ø (Jahre ± SD)	56,4 ± 8,97	57,1 ± 12,74
invasiv duktal (IDC)	39	14
invasiv lobulär (ILC)	8	2
IDC und ILC	0	1
invasiv medullär	3	0
invasiv duktulo-lobulär	1	1
invasiv szirrhös	1	0
nicht näher spezifiziert	2	17
Sonstige	1	2
Oropharynxkarzinom	0	2
Lungenkarzinom	1	0

Tabelle 12: Die Eigenschaften „Geschlecht, Alter und Tumortyp“ im Patientenkollektiv

nebenwirkungsreichen Gruppe von 29 bis 77 Jahren, in der nebenwirkungsarmen von 33 bis 81 Jahren.

zität mehr Frauen als Männer zu finden sind. Dies lässt sich durch die zahlreichen therapiebedingten Nebenwirkungsfälle unter Patientinnen mit Mammakarzinom erklären. Die Rekrutierung von Fällen in der Frauenklinik erfolgte mit dem Augenmerk auf Patientinnen mit Nebenwirkungen.

Im Altersvergleich sind die beiden Nebenwirkungsgruppen mit einem durchschnittlichen Unterschied von 0,9 Jahren in etwa gleich. Hierbei ist die Gruppe „Toxizität °III - °IV“ mit einem Altersdurchschnitt von 59,4 Jahren bei einer Standardabweichung von 10,53 geringfügig älter als die Gruppe „leichte/keine Toxizität“ mit einem durchschnittlichen Alter von 58,5 Jahren bei einer Standardabweichung von 10,48. Die Altersspanne reicht dabei in der

Bei der Betrachtung der verschiedenen Tumorentitäten fällt auf, dass das Patientenkollektiv mit gastrointestinalen Tumoren älter ist, als das mit Mammakarzinom. Dies hängt mit dem meist späteren Manifestationsalter maligner gastrointestinaler Tumoren im Vergleich zu Mammakarzinomen zusammen.

Die in Tabelle 13 aufgeführte Einteilung nach Chemotherapie-schemata ist aufgliedert entsprechend der Applikationsart von 5-FU. Dabei wird zwischen Bolusapplikation wie bei den älteren Mayo- oder Machoverregimen und einer Applikation über eine Stunde wie in den gynäkologischen CMF- oder FEC-Schemata unterschieden. Von diesen eher kurzen Gaben abzugrenzen sind die Chemotherapiepläne mit kontinuierlicher Dauerinfusion über 24 Stunden, wie PLF, OLF, oder das Douillard- oder FUFOX-Regime. Auch werden Dauerinfusionen parallel zur Strahlentherapie eingesetzt. Darüber hinaus gibt es die FOLFOX- und Folfiri-Schemata,

CHEMOTHERAPIE-SCHEMA	leichte/keine Toxizität n = 186	Toxizität °III - °IV n = 90
Bolusapplikation	2	6
Mayo	2	4
Machover	0	2
Applikation über 1h	54	33
CMF	21	7
FEC	32	23
CMF oder FEC	1	3
kont. Dauerinfusion	106	37
PLF± Paclitaxel/Docetaxel	55	22
OLF	22	7
Irinotecan/5-FU/FA (Douillard – AIO)	1	0
Ardalan/OLF	1	0
Cisplatin/5-FU + RTX	4	0
FUFOX	3	0
5-FU/RTX	12	7
PLF/OLF	5	1
Irinotecan/5-FU/FA (Douillard - AIO)/ OLF	3	0
Bolusapplikation und Dauerinfusion	15	7
CAO/ARO/AIO-04 Studie (Kontrollarm)	1	0
FOLFOX 4	4	4
FOLFOX 6	6	2
Folfiri	2	1
FOLFOX 4/Folfiri	1	0
FOLFOX 6/OLF	1	0
orale Applikation (Capecitabine)	2	4
CapOx=Xelox	1	0
XELIRI/Folfiri ³	0	1
Xeloda/CMF ⁴	0	1
Xeloda	0	2
Xeloda/FOLFOX 4 ⁵	1	0
Sonstige	7	3
Avastin/5-FU/ Leukovorin nicht näher spezifiziert (5-FU-haltig)	1	0
Avastin/Irinotecan/5-FU/ Leukovorin	5	3
	1	0

Tabelle 13: Die Eigenschaft „Chemotherapie-schemata“ im Patientenkollektiv

³ Diese Patientin (Patient 16 in Tabelle 15) mit Nebenwirkungen wird trotz ebenfalls applizierter Therapie nach dem Folfiri-Schema zur Kategorie „orale Applikation“ gezählt, da die Nebenwirkungen unter dem XELIRI-Schema auftraten.

⁴ Diese Patientin (Patient 50 in Tabelle 15) mit Nebenwirkungen wird zur Kategorie „orale Applikation“ gezählt, da die Therapie mit Xeloda aufgrund von Nebenwirkungen abgebrochen wurde und nicht die nach dem CMF-Schema.

⁵ Diese Patientin ohne Nebenwirkungen wird zur Kategorie „orale Applikation“ gezählt, da sie Xeloda über einen langen Zeitraum einnahm, während nur ein Zyklus FOLFOX 4 appliziert wurde.

bei denen 5-Fluorouracil sowohl als Bolus, als auch als Dauerinfusion appliziert wird. Es wurden nur 6 Personen mit einem, eigentlich durchaus weit verbreiteten,

P A T I E N T	A L L E R T	G E S C H L I C H E M O T H E R A P I E	T O X I Z I T Ä T ⁺	T O X I Z I T Ä T ⁺				
				496 A>G	IVS10-15T>C	1236G>A	c.1129-5923C>G	IVS12-1G>A
53	67	m Machover	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
54	52	m OLF	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
55	29	w FEC	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
56	48	m PLF + Paclitaxel	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	*
57	66	w PLF, OLF	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
58	66	m PLF	°III-°IV	G/G	C/C	G/G	C/C	
59	52	m PLF + Paclitaxel	°III-°IV	A/G	T/T	G/G	C/C	
60	64	m OLF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
61	76	w 5-FU/RTX	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
62	64	m PLF	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
63	70	w 5-FU/RTX	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
64	69	m Mayo	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
65	71	m PLF + Paclitaxel	°III-°IV	A/A	T/C	G/G	C/C	
66	56	w Mayo	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
67	68	m PLF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
68	68	m OLF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
69	61	m PLF + Docetaxel	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
70	49	w CMF	°III-°IV	A/G	T/T	G/G	C/C	*
71	60	w 5-FU ⁺	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
72	65	w 5-FU ⁺	°III-°IV	*	*	G/G	C/C	
73	59	m PLF + Paclitaxel	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
74	58	w Mayo	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
75	67	w FEC	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
76	71	w OLF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
77	42	m 5-FU/RTX	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
78	70	w 5-FU/RTX	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
79	76	w CMF	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
80	71	w 5-FU ⁺	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	*
81	45	w CMF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
82	71	m PLF	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
83	71	m Mayo	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
84	53	w FEC	°III-°IV	G/G	C/C	G/G	C/C	
85	46	m 5-FU/RTX	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
86	61	w CMF	°III-°IV	A/G	T/C	G/G	C/C	
87	63	w 5FU/RTX	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
88	62	w FEC	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	
89	56	w FEC	°III-°IV	G/G	C/C	G/G	C/C	
90	37	w 5-FU ⁺	°III-°IV	A/A	T/T	G/G	C/C	

Tabelle 14: Patientencharakteristik und Ergebnisse der SNP-Analysen für die restlichen 38 Patienten/-innen aus der Toxizitätsgruppe mit nicht näher spezifizierten Nebenwirkungen °III - °IV

*nicht spezifiziert; *nicht bestimmbar

me, dass sich die Profile aufgrund der Applikationsweise von 5-Fluorouracil unterscheiden, wurden die Therapieschemata ebenfalls in der Tabelle dargestellt. Sortiert wurden die Personen nach maßgeblicher Nebenwirkungsart in eine Gruppe mit vorrangig hämatologischen Nebenwirkungen (Patient 1-28),

Capecitabine-haltigen Therapieplan rekrutiert. Dies hängt damit zusammen, dass diese Therapie mit seltenerem Kontakt zur Klinik, meist „heimatnah“ durchgeführt werden kann und somit Personen mit Capecitabine-haltiger Chemotherapie für eine Studie an der Universitätsklinik kaum zur Verfügung stehen.

Bei Betrachtung der 90 Personen mit aufgetretener schwerer Toxizität liegen bei 52 genaue Daten bezüglich des Nebenwirkungsprofils vor. Bei den restlichen 38 hingegen sind die schweren Nebenwirkungen nicht näher spezifiziert (vgl. Tabelle 14).

Die vorliegenden Toxizitätsprofile der anderen 52 Personen können Tabelle 15 entnommen werden. Entsprechend der Annahme,

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

P A T I E N T	G E S C H L E C H E M O T H E R A P I E	Hämatotoxizität				Toxizität im Magen- Darm-Trakt			S O N S T I G E	496 A>G	IVS10-15T>C	1236G>A	c.1129-5923C>G	IVS12-1G>A
		L	T	A	G	M	Ü/E	D						
1	66 w FEC	¶III								A/A	T/T	G/A	*	
2	71 w FEC	¶IV								A/A	T/C	G/G	*	
3	59 w FEC	¶III								A/G	T/T	G/G	*	
4	47 w FEC	¶III								A/A	T/T	G/G	C/C	
5	43 w FEC	¶IV								A/A	T/T	G/G	C/C	
6	74 w FEC	¶IV								A/A	T/T	G/G	*	
7	45 w 5-FU*	¶IV	¶III							A/G	T/C	G/G	*	
8	69 w FEC	¶IV	¶IV							A/A	T/C	G/G	*	
9	77 w FEC	¶III-¶IV								*	*	G/G	*	
10	47 w FEC	¶IV								A/G	T/C	G/G	C/C	
11	53 w FEC				¶IV					A/A	T/T	G/G	C/C	
12	68 w FEC	¶IV	¶IV	¶IV	¶IV					*	*	G/A	C/G	
13	39 m PLF + Paclitaxel	¶III								A/A	T/T	G/G	C/C	
14	47 m PLF + Docetaxel	¶III								A/A	*	G/G	*	
15	51 m PLF + Paclitaxel	¶III								A/A	T/T	G/G	C/C	
16	75 w XELIRI/Folfiri	¶III								A/G	T/C	G/G	*	
17	57 w FOLFOX 6	¶III		¶III	¶III					A/A	T/T	G/G	*	
18	60 w FOLFOX 4				¶III					A/G	T/C	G/G	*	
19	60 m PLF				¶III					A/A	T/T	G/G	*	
20	55 w FOLFOX 4				¶III					A/A	T/T	G/G	*	
21	62 w OLF				¶III					A/A	T/T	G/G	*	
22	62 m PLF				¶III					A/G	T/C	G/G	*	
23	57 w FOLFOX 4				¶III					A/A	T/T	G/G	*	
24	58 m PLF + Docetaxel				¶IV					A/A	T/T	G/A	C/G	
25	63 w FEC	¶IV								A/A	T/T	G/G	*	
26	67 w FEC	¶IV	¶III							A/A	T/T	G/G	C/C	
27	63 w FEC		¶IV		¶IV					A/A	T/T	G/G	C/C	
28	77 w CMF				¶III					A/A	T/T	G/G	*	
29	53 m PLF					¶III				A/A	*	G/G	*	
30	62 m PLF + Paclitaxel					¶III				A/A	T/T	G/A	C/G	
31	69 w FOLFOX 4					¶IV				A/A	T/T	G/G	*	
32	65 m OLF					¶IV				A/A	T/T	G/G	*	
33	63 w PLF					¶III				A/A	T/T	G/G	C/C	
34	59 m PLF + Docetaxel					¶III	¶III			A/A	T/T	G/G	*	
35	52 w Capecitabine					¶IV	¶III	¶IV		A/A	*	G/G	C/C	
36	45 w FEC					¶III		¶III		A/A	T/T	G/G	C/C	
37	51 w CMF					¶III				*	T/T	G/G	*	
38	37 w FEC					¶III	¶IV			A/A	T/T	G/G	C/C	
39	59 m PLF + Docetaxel	¶III				¶III	¶III			A/A	T/T	G/G	*	
40	47 m Folfiri					¶III				A/A	T/T	G/G	*	
41	53 w Machover			¶IV		¶III				*	*	G/G	C/C	
42	63 m Capecitabine			¶IV		¶III-¶IV		¶III		A/A	*	G/G	C/C	G/A
43	50 w PLF + Docetaxel					¶III		¶III		A/A	*	G/G	*	
44	64 w CMF				¶III			¶IV	¶II	A/A	T/T	G/A	C/G	
45	66 w FEC	¶III				¶III	¶III			A/A	T/T	G/G	C/C	
46	59 w FEC				¶IV		¶III	¶III		A/A	T/T	G/G	*	
47	59 w PLF			¶III		¶IV	¶III	¶IV		A/G	T/C	G/G	*	
48	57 m FOLFOX 6								HFS	A/G	T/C	G/G	*	
49	70 m 5-FU/RTX								K	*	*	G/A	C/G	
50	36 w Capecitabine/CMF								K	A/A	T/T	G/G	*	
51	62 m 5-FU*								†	A/A	T/T	G/G	C/C	
52	76 m OLF								K, †	A/G	T/C	G/G	C/C	

Tabelle 15: Patientencharakteristik und Ergebnisse der SNP-Analysen der 52 Patienten/-innen mit genau dokumentierten Nebenwirkungen

L = Leukopenie; T = Thrombozytopenie; Hb = Anämie; G = Neutropenie; M = Mukositis

Ü/E = Übelkeit/Erbrechen; D = Diarrhoe; N = Neurotoxizität; K = Kardiotoxizität

HFS = Hand-Fuß-Syndrom; † = verstorben; * nicht näher spezifiziert; *nicht bestimmbar

wie Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie und Neutropenie, und eine zweite Gruppe mit in erster Linie gastrointestinalen Nebenwirkungen (Patient 29 – 38), wie Mukositis, Übelkeit/Erbrechen und Diarrhoe. Bei manchen traten jedoch sowohl hämatologische, als auch gastrointestinale Nebenwirkungen auf (Patient 39 - 47). Unter „Sonstige“ (Patient 48 – 52) sind kardiale, neurologische Nebenwirkungen, sowie die Ausbildung eines Hand-Fuß-Syndroms und auch Fälle mit tödlichem Ausgang zusammengefasst.

5.4 Spleißmutation IVS12-1G>A

Wie unter Kapitel 3. Zielsetzung der Arbeit (S.32) beschrieben, wurden nicht nur Patientenproben auf die SNPs c.496A>G, IVS10-15T>C, c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G hin untersucht, um im Rahmen einer Studie, ohne Einfluss auf die klinische Therapie, einen Zusammenhang zwischen Nebenwirkungen unter Therapie mit 5-FU und dem Vorliegen des jeweiligen SNPs zu ziehen. Darüber hinaus wurden Proben von Patienten mit schwerwiegenden Nebenwirkungen durch den jeweiligen behandelnden Arzt mit der Bitte um Abklärung an unsere Arbeitsgruppe weitergeleitet. Bei der hier durchgeführten DPYD-Diagnostik wurden über das für die Studie hinausgehende Maß Untersuchungen durchgeführt, auch andere Exons betreffend. Das Ergebnis konnte hier unter Umständen Einfluss auf die weitere Therapie nehmen.

Im Falle eines solchen Patienten, wurde im Rahmen dieser Diagnostik die Spleißmutation IVS12-1G>A gefunden.

5.4.1 Patientencharakteristik

Es handelt sich um einen männlichen Patienten mit 63 Jahren (Patient 42 in Tabelle 15) mit einem lokal fortgeschrittenen Karzinom im *Colon descendens*. Mit dem zweiten Zyklus Chemotherapie mit Capecitabine (Xeloda®) und Irinotecan kam es zu ausgeprägter Toxizität. Die Therapie wurde aufgrund einer Neutropenie °IV, einer Mukositis °III – °IV und Diarrhoe °III unterbrochen.

5.4.2 Analyse mittels DHPLC

Nach Isolierung der DNA aus der Blutprobe wurden zunächst die Exons 2, 4, 6, 10, 11, 13, 14 und 22 des DPYD-Gens mit der DHPLC auf bekannte Mutationen untersucht, die die Toxizität hätten erklären können. Hierbei ergaben sich keine Auffälligkeiten mit Ausnahme einer unbekanntes heterozygoten Mutation im Exon 13. Das bis dahin nicht zu zuordnende DHPLC-Ergebnis, sowie die Kurve der Wildtypkontrolle für Exon 13 ist in Abbildung 30 dargestellt.

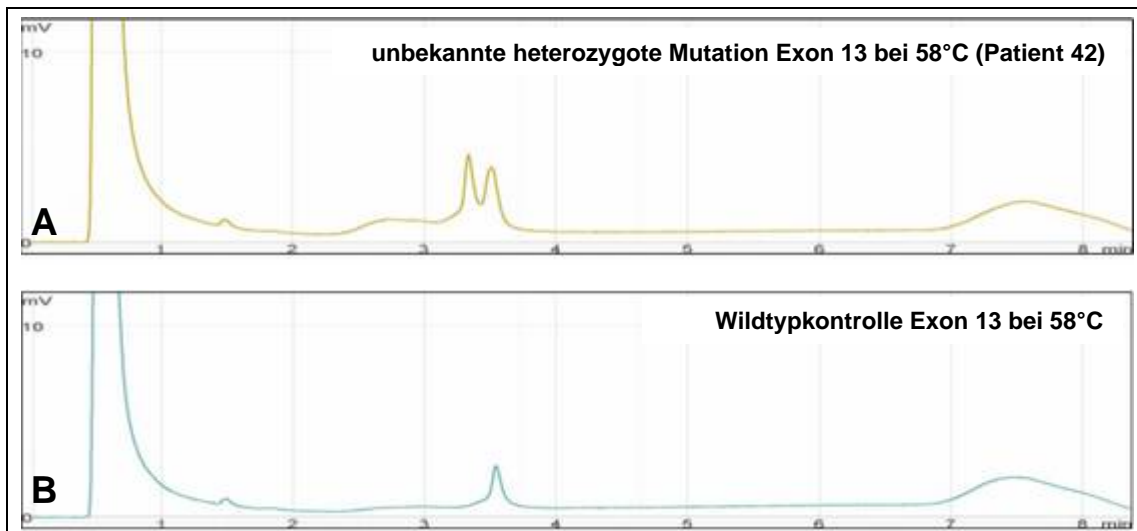


Abbildung 30: Vergleich der DHPLC-Profile des Exon 13 der Wildtypkontrolle (B) und einer unbekanntes heterozygoten Mutation (A)

5.4.3 Sequenzanalyse der genomischen DNA

In der folgenden Sequenzierung der genomischen DNA ergab sich für das Exon 13 (mit angrenzender Intronteilsequenz), wie Abbildung 31 zu entnehmen, eine heterozygote Punktmutation an Stelle IVS12-1G>A. Wie Wei et al. beschrieben, folgen alle Exon-Intron-Grenzen des DPYD-Gens der GT-AG-Regel (vgl. Wei, Elizondo et al., 1998), die besagt, dass Introns mit GT beginnen und mit AG enden (vgl. Buselmaier et Gholamali, 2007, S.10), wodurch die Grenzen für den Spleißvorgang eindeutig festgelegt sind.

Somit lag die Vermutung nahe, dass der Austausch AG zu AA, im besonders konservierten Areal im Bereich der Exon-Intron-Grenze, an der unveränderlichen Spleißstelle IVS12-1G>A höchstwahrscheinlich Einfluss auf die Prozessierung der prä-mRNA hat.

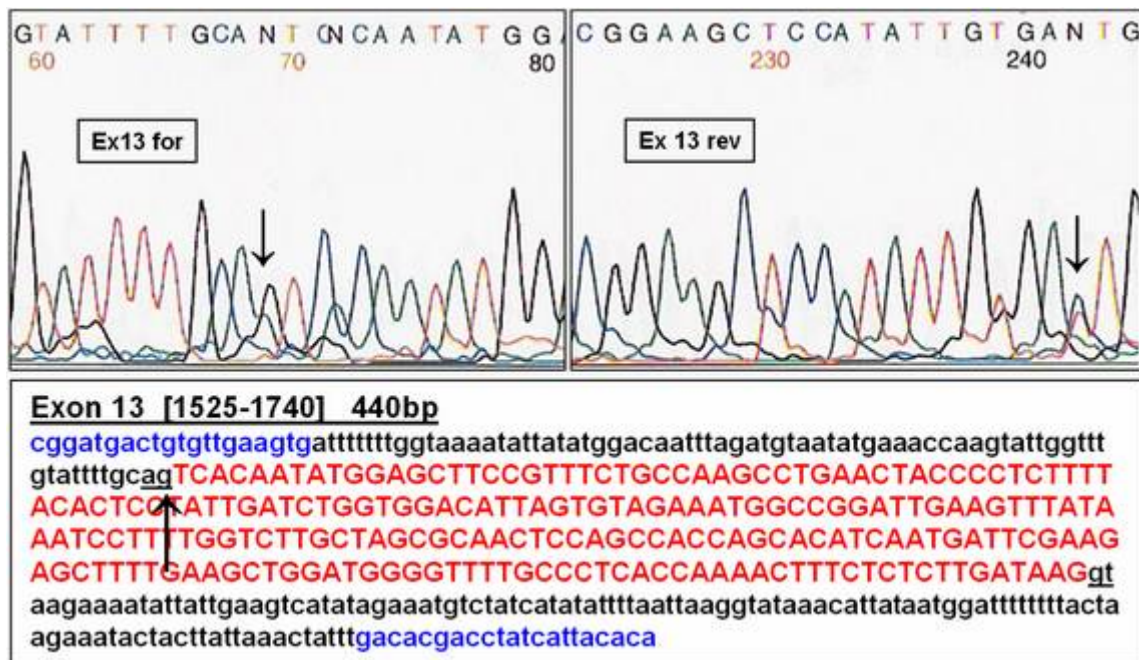


Abbildung 31: Sequenzausschnitt von Patient 42 um IVS12-1G>A im Exon 13

oben: In den beiden Sequenzen sind an entsprechender Stelle (Pfeil) jeweils zwei unterschiedliche Basen zu erkennen. In der Forward-Sequenz tritt zu dem üblichen Guanin ein Adenin hinzu. In der Reverse-Sequenz ist über das komplementär übliche Cytosin hinaus ein Thymin erkennbar.

unten: Zu erkennen ist die durch die Primer (blau) vorgegebene Sequenz, mit einem Intronanteil (schwarz) und der Exonsequenz (rot). Die Stelle der Mutation (Pfeil) liegt an der AG-Akzeptor-Spleißstelle (schwarz, unterstrichen).

5.4.4 Analysen der cDNA

Um Informationen über die Auswirkungen dieser Mutation zu erhalten und zu bestätigen, dass sich hieraus Auswirkungen auf den Spleißvorgang ergeben, war es sinnvoll, zusätzlich auf RNA-Ebene eine Sequenzierung durchzuführen.

Nach erneuter Blutabnahme in das spezielle PAXgene™ Röhrchen, wurde die RNA isoliert (entsprechend 4.15 RNA-Isolierung aus Vollblut, S.53), mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (entsprechend 4.16 Amplifikation von mRNA durch RT-PCR, S.54) und mit Hilfe einer PCR amplifiziert.

Für die Reverse Transkription wurde zur Absicherung ein Ansatz mit *Random* Primern durchgeführt, der andere Ansatz erfolgte mit den spezifischen Primern 5 for und 6 rev. Da der folgende PCR-Schritt bei beiden Ansätzen ebenfalls mit den Primern 5 for und 6 rev erfolgte, sollten beide zu erwartenden Produkte die gleiche Sequenzlänge aufweisen. Die Wahl der Primer kann in Abbildung 32 nachvollzogen werden. Diese erfolgte so, dass ein ausreichend großes Stück die Stelle der Mutation auf DNA-Ebene flankiert. Die amplifizierte Frequenz des Wildtyp-Allels lässt eine Größe von 817 bp erwarten.



Abbildung 32: Primerauswahl für die cDNA

* markiert die Position der Mutation IVS12-1G>A auf DNA-Ebene

Diese erfolgte so, dass ein ausreichend großes Stück die Stelle der Mutation auf DNA-Ebene flankiert. Die amplifizierte Frequenz des Wildtyp-Allels lässt eine

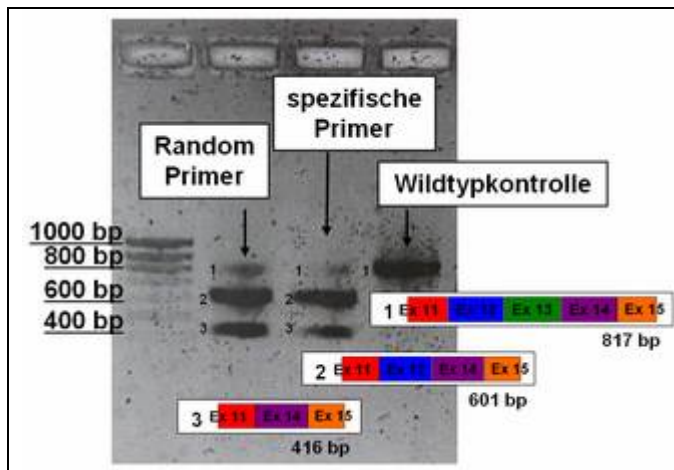


Abbildung 33: Gelbild der cDNA-Ansätze von Patient 42 mit *Random* Primern und den spezifischen Primern 5 for und 6 rev

Links ist der verwendete Längenstandard (100 bp DNA-Leiter) zu sehen, sowie rechts die Bande der Wildtypkontrolle.

handelt es sich aufgrund der Größe von ungefähr 800 bp um die Wildtypsequenz. Die anderen beiden Banden mit einer Fragmentgröße von ca. 600 bp bzw. 400 bp können durch das Gel allein nicht zugeordnet werden.

Anschließend wurden die Produkte zunächst über Gelelektrophorese aufgetrennt und abfotografiert. Das entstandene Bild ist in Abbildung 33 dargestellt. Zu erkennen sind bei beiden Ansätzen jeweils drei Banden. Bei der im elektrischen Feld am wenigsten weit zur Anode gewanderten obersten Bande mit dem somit größten DNA-Fragment handelt es sich aufgrund der Größe von ungefähr 800 bp um die Wildtypsequenz.

Aus diesem Grunde wurde das amplifizierte cDNA-Fragment zusätzlich sequenziert. Das Ergebnis ist im Anhang ersichtlich. Dort erkennt man eine sich zum Teil überlappende Sequenz. Dieser Abschnitt ist mit den beiden Pfeilen markiert. Vergleicht man dieses sequenzierte Stück anhand der Basenzahl mit den entsprechenden Exons des DPYD-Gens, so ergeben sich zwei Varianten für die reife mRNA, die durch die Punktmutation IVS12-1G>A in der genomischen DNA entstehen und die den beiden unteren Banden aus Abbildung 33 entsprechen.

Bei der mittleren Bande mit dem somit längeren Fragment handelt es sich um eine 601 bp große Sequenz, bei der das 216 bp große Exon 13 fehlt. Die untere Bande in Abbildung 33 stellt das mit 416 bp kürzeste Fragment dar. Hier fehlt zusätzlich zu Exon 13 auch das 185 bp große Exon 12. Zusammen fällt hier beim Spleißvorgang ein 401 bp großes Fragment heraus.

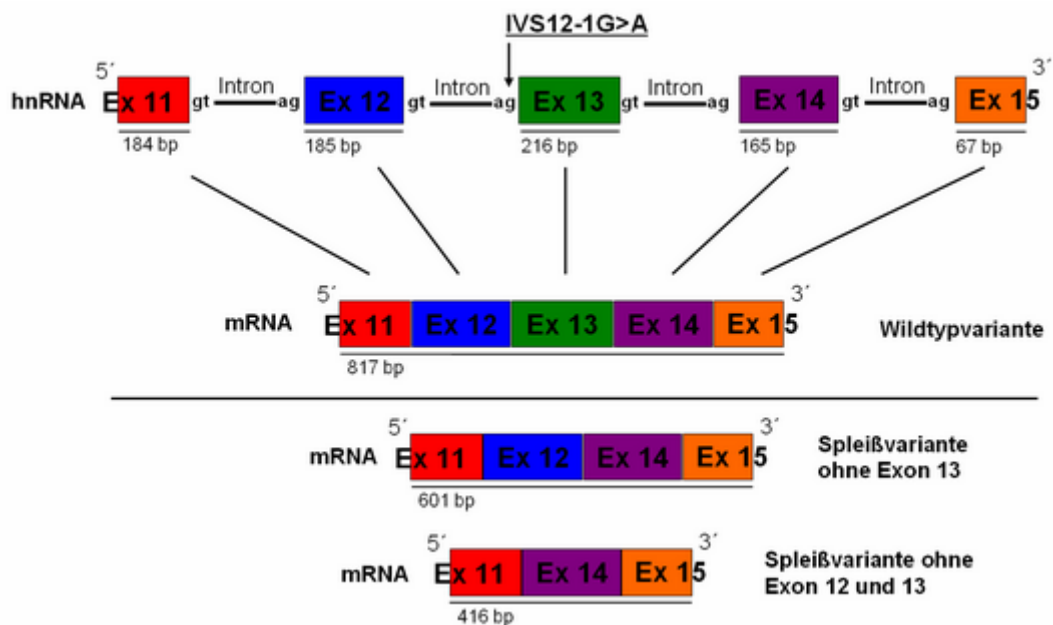


Abbildung 34: Schematische Darstellung des *in vivo* ablaufenden Spleißvorgangs

Physiologischer Weise entsteht im Zellkern nach erster Abschrift der genomischen DNA, der *heterogenous nuclear RNA* (hnRNA bzw. prä-mRNA), über Reifungsprozesse die reife mRNA. Durch Spleißprozesse ist die mRNA um die Intronsequenzen kürzer.

Im Patienten 42 entstehen neben der Wildtyp-mRNA durch die Mutation IVS12-1G>A bedingt auch mRNA Varianten, in denen entweder das Exon 13, oder das Exon 12 und 13 fehlt.

In vitro wurde dieser fehlerhafte Spleißvorgang durch die reverse Transkription von reifer mRNA des Patienten in cDNA und anschließender Sequenzierung nachgewiesen.

Die Wildtypvariante kommt im Sequenzierergebnis (vgl. Anhang) wohl nicht vor, da es durch die Terminationsnukleotide bei der PCR-Reaktion als längstes

Fragment benachteiligt wird. Sie ist jedoch als Bande in der Fotografie nach Gelelektrophorese sichtbar (vgl. Abbildung 33).

Das Entstehen der zwei gerade beschriebenen, vom Wildtyp abweichenden Spleißvarianten ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.

Durch das Resultat der durchgeführten Sequenzierung konnten auch die Banden der Gelelektrophorese den entsprechenden Spleißvarianten zugeordnet werden (vgl. Abbildung 33).

Zum direkten Vergleich mit dem im Anhang zu

findenden Sequenzierergebnis sind die beiden im Sequenzer sichtbaren Varianten der mRNA in Abbildung 35 übereinander gelegt dargestellt.

```
Ex11 →  
GAATTTCTGCCATTCTGTCCCCACGGAAGGTTATAGTAAAAGGTGGGAGAATTGTTGCTAT  
GAATTTCTGCCATTCTGTCCCCACGGAAGGTTATAGTAAAAGGTGGGAGAATTGTTGCTAT  
Ex11 →  
GCAGTTTGTTCGGACAGAGCAAGATGAAACTGGAAAATGGAATGAAGATGAAGATCAGAT  
GCAGTTTGTTCGGACAGAGCAAGATGAAACTGGAAAATGGAATGAAGATGAAGATCAGAT  
GGTCCATCTGAAAGCCGATGTGGTCATCAGTGCCTTTGGTTCAGTTCTGAGTGATCCTAAAG  
GGTCCATCTGAAAGCCGATGTGGTCATCAGTGCCTTTGGTTCAGTTCTGAGTGATCCTAAAG  
Ex12 →  
TAAAAGAAAGCCT TGAGCCCTATAAAAATT TAACAGATGGGGTCTCC CAGAAGTAGATCCAG  
GACATTG TGACAAATGT TTCCCCCAGAATC ATCCGGGGAACACCTCT GGCCCCATGTAT  
Ex14 →  
AAACATGCAAACACTAGTGAAGCATGGGTATTTGCAGGTGGTATGTCGT TGGTTTGGCTAA  
GGCCCTGGACAAAGCTCCT TTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGAGAAAACGGCTGCATATT  
CACTACAGTGGAAATCGGTGAATGATGAAAAGCAAGCTTCTT GGTACATTCAAAATACGTA  
GGTGTCAAAGTGTCACTGAACTAAAGGCTGA CTTCCAGACAACATTGTGAT TGCTAGCAT  
Ex15 →  
Ex14 →  
CAGGACATT GTGACAAATGT TTCCCCAG AATCATCCGGGGAACACCTC TGGCCCCATG  
TATGT GCAGTTACAAT AAAAATGACTGGACGGAACCTTGCCA AGAAGTCTG  
TATGGCCCTGGACAAAGCTCCTTTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGAGAAAACGGCTGCAT  
ATTGGTGTCAAAGTGTCACTGAACTAAAGGCTGACTTCCAGACAACATTGTGATTGCTAG  
Ex15 →  
CATTATGTGCAGTTACAATAAAAATGACTGGACGGAACCTTGCCAAGAAGTCTG
```

Abbildung 35: Die beiden aus der Punktmutation IVS12-1G>A resultierenden Varianten der mRNA im Vergleich.

Die oben dargestellte Sequenz stellt die Spleißvariante dar, bei der das Exon 13 verloren gegangen ist. In der unteren Sequenz wurde neben Exon 13 auch Exon 12 herausgespleißt.

5.4.5 Follow up des Patienten

Bis zum Ergebnis der Laboruntersuchungen wurde die ursprünglich angedachte Chemotherapie, unter der die Nebenwirkungen auftraten, auf 66 % der Standarddosis reduziert. Die zwei folgenden Zyklen verliefen weitgehend unauffällig, doch mit dem 3. Zyklus kam es erneut zu ausgeprägter Leukopenie. Daraufhin wurde die Therapie auf ein neues, 5-FU-freies Schema umgestellt. Der Patient erhielt nun Oxaliplatin in Kombination mit dem spezifischen Thymidylat-synthase-Hemmstoff Raltitrexed (Tomudex®).

5.5 Ergebnisse zu den SNPs *c.496A>G*, *IVS10-15T>C* und *c.1236G>A* im *DPYD*-Gen

Als zentrale Fragestellung dieser Arbeit wurden sowohl die Patientenproben, als auch die Proben des Kontrollkollektivs nach PCR-Reaktion mittels DHPLC auf das Vorliegen von *c.496A>G*, *IVS10-15T>C* und *c.1236G>A* untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet.

5.5.1 DHPLC-Analysen von *c.496A>G*, *IVS10-15T>C* und *c.1236G>A*

Die DHPLC wurde für das Exon 6 zur Detektierung von *c.496A>G* bei 58°C durchgeführt. Hierbei ist *c.496A>G* durch die charakteristische Kurve gut von der seltenen Variante *IVS5-8C>T* zu unterscheiden (vgl. Abbildung 36), die in keiner der Proben gefunden wurde.

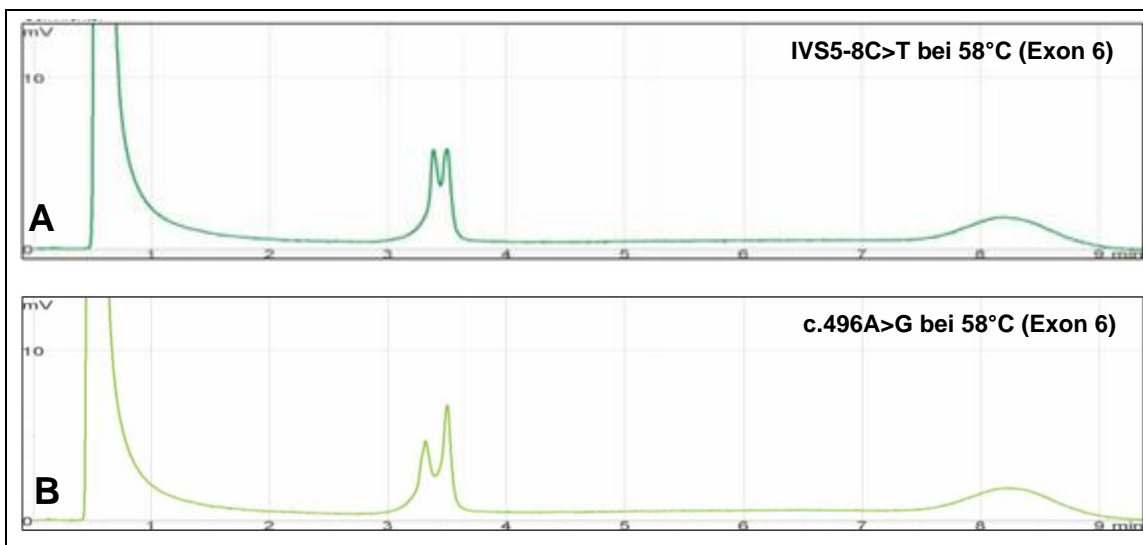


Abbildung 36: Vergleich der DHPLC-Profile für *IVS5-8C>T* (A) und *c.496A>G* (B)

Der mit *c.496A>G* gekoppelt auftretende SNP *IVS10-15T>C* sowie *c.1236G>A* sind beide durch die PCR mit den Primern für Exon 11 erfasst. Jedoch sind für die eindeutige Identifikation mittels DHPLC unterschiedliche Temperaturen nötig. *IVS10-15T>C* zeigt bei 55°C ein eindeutiges Profil und ist dadurch gut von dem auch möglichen SNP *IVS10-28G>T* abzugrenzen (vgl. Abbildung 37). *IVS10-28G>T* ist ebenfalls in dem Patientenkollektiv nicht vorgekommen.

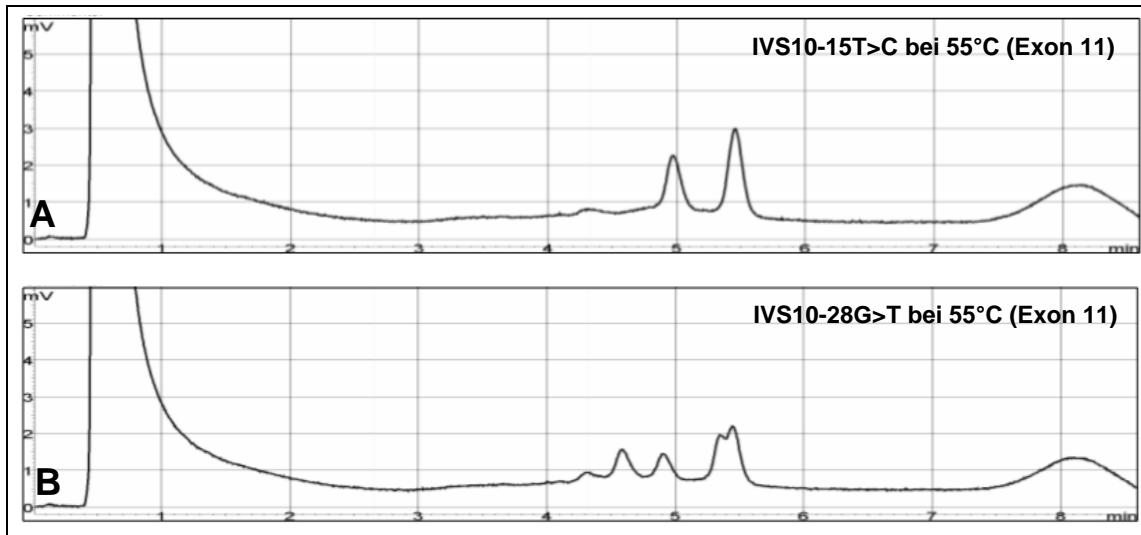


Abbildung 37: Vergleich der DHPLC-Profile für IVS10-15T>C (A) und IVS10-28G>T (B)

Der gesuchte SNP c.1236G>A in Exon 11 des DPYD-Gens unterscheidet sich hingegen bei 59°C in der DHPLC-Analyse durch sein Kurvenprofil deutlich von der bei gleichen Temperaturverhältnissen detektierbaren Variante c.1218G>A (vgl. Abbildung 38). c.1218G>A ist innerhalb des Patientenkollektivs nicht aufgetreten.

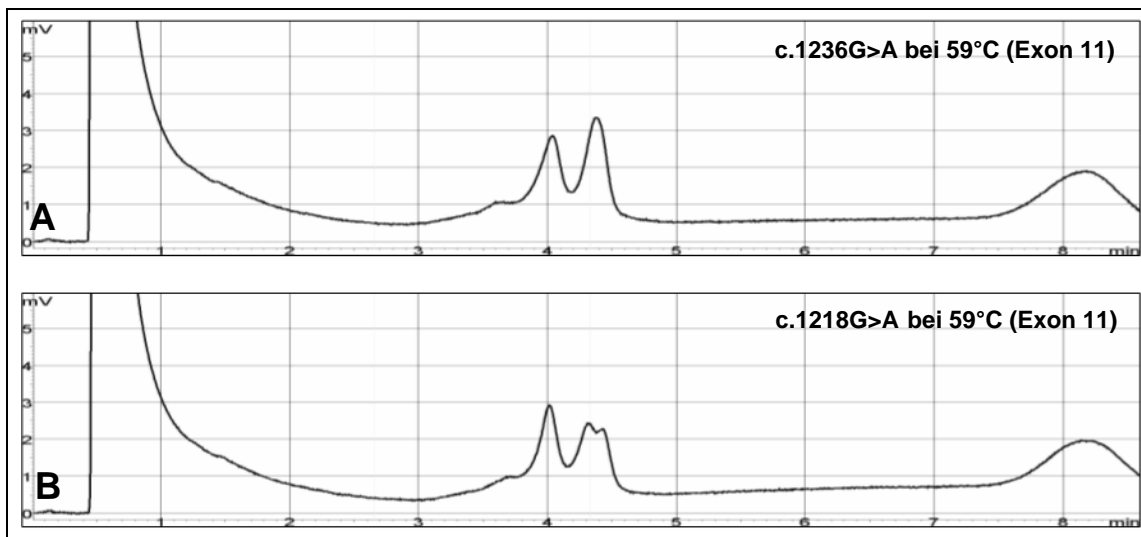


Abbildung 38: Vergleich der DHPLC-Profile für c.1236G>A (A) und c.1218G>A (B)

5.5.2 Genotyphäufigkeiten von c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A in den verschiedenen Kollektiven

Zur Abschätzung, ob bestimmte Polymorphismen bei bestimmten Tumorarten im Vergleich zur Normalbevölkerung gehäuft vorkommen, wurden die Genotyphäufigkeiten der einzelnen SNPs berechnet. Hierfür wurde ein Kontrollkollektiv zusammengestellt, das sich sowohl aus Patientinnen der Frauenklinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, bei denen weder zum Zeitpunkt der Blutabnahme, noch in der Vergangenheit eine Tumorerkrankung bekannt ist, sowie aus Klinikmitarbeitern/-innen des Klinikums zusammensetzt. Insgesamt wurden 150 Proben untersucht.

Die Tumorgruppen „Mammakarzinom“ und „maligne gastrointestinale Tumoren“ wurden mit diesem Kontrollkollektiv verglichen, um Häufigkeitsunterschiede erkennen zu können. Um die Patientenanzahl in der Gruppe „Mammakarzinom“ zu erhöhen, wurden hier zusätzlich 148 Proben von Patientinnen aus der Frauenklinik und Poliklinik mit einem Mammakarzinom und unklarer, nicht-5-FU haltiger oder fehlender Chemotherapie, analysiert. Das Kollektiv „Mammakarzinom“ umfasst damit 271 Fälle. In dieses Kollektiv fließen mit den 148 zusätzlichen, die bezüglich Toxizität gewerteten und bereits erwähnten 89, sowie die 34 nicht gewerteten Fälle dieser Gruppe ein.

Die Tumorgruppe „maligne gastrointestinale Tumoren“ umfasst mit den 184 bezüglich Toxizität untersuchten und den 13 nicht gewerteten Fällen dieser Gruppe, insgesamt 197 Patienten/-innen.

Für diesen Vergleich stehen, aufgrund der Kontrollgruppe und des Anteils an Patienten/-innen ohne Relevanz für die Toxizitätsanalyse, nur Daten für die Heterozygotenfrequenz zur Verfügung, da dieser Anteil an Proben, mit der DHPLC der Einfachheit halber nicht über einen Probenpool auf Homozygotie untersucht wurde.

Die Ergebnisse der Frequenzbestimmungen für c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A in der Kontrollgruppe aus 150 Kaukasiern, sowie unter den Studienteilnehmern/-innen aufgeteilt nach Tumorentität, sind in Tabelle 16 dargestellt.

	c.496A>G					IVS10-15T>C					c.1236G>A				
	A/A* n=476	A/G n=104	HF	OR [KI]	p	T/T* N=459	T/C n=126	HF	OR [KI]	p	G/G* n=564	G/A n=34	HF	OR [KI]	p
Kontrollgruppe	120	19	13,7%			111	26	19,0%			130	8	5,8%		
Mammakarzinom	205	46	18,3%	1,42 [0,79; 2,53]	0,238	200	58	22,5%	1,24 [0,74; 2,08]	0,418	243	20	7,6%	1,34 [0,57; 3,11]	0,503
maligne GI-Tumoren	151	39	20,5%	1,63 [0,90; 2,96]	0,107	148	42	22,1%	1,21 [0,70; 2,09]	0,490	191	6	3,0%	0,51 [0,18; 1,48]	0,215

Tabelle 16: Vergleich der Häufigkeiten von c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A im Patientenkollektiv „Mammakarzinom“ bzw. „maligne GI-Tumoren“ im Vergleich zur Kontrollgruppe

OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall; HF = Heterozygotenfrequenz; p = p-Wert

* enthält im Kontrollkollektiv unter Umständen eine vernachlässigbare Anzahl an Homozygoten, die mit der Methodik nicht bestimmt werden konnte

Die Varianten c.496A>G und IVS10-15T>C waren sowohl im Kollektiv „Mammakarzinom“, als auch bei Patienten/-innen mit malignen gastrointestinalen Tumoren häufiger, als in der Kontrollgruppe. Auch der SNP c.1236G>A trat zumindest in der Gruppe mit Mammakarzinom im Vergleich zu der Kontrollgruppe gehäuft auf, war jedoch bei Personen mit malignen Tumoren im Magen-Darm-Trakt seltener, als in der Normalbevölkerung. Diese Ergebnisse sind mit p-Werten zwischen 0,107 und 0,503 statistisch nicht signifikant.

5.5.3 Kopplung von c.496A>G und IVS10-15T>C

Die SNPs c.496A>G und IVS10-15T>C treten häufig zusammen auf. In dem

c.496A>G \ IVS10-15T>C	IVS10-15T>C			Gesamt
	Wildtyp	heterozygot	homozygot	
Wildtyp	220	12	0	232
heterozygot	8	55	0	63
homozygot	1	0	7	8
Gesamt	229	67	7	303

Tabelle 17: Kreuztabelle zum Kopplungsverhalten zwischen c.496A>G und IVS10-15T>C im gesamten Patientenkollektiv

Patientenkollektiv, bestehend aus 323 Personen mit maligner Grunderkrankung, lagen bei 303 Personen Daten sowohl für c.496A>G als auch für IVS10-15T>C vor.

Das Kopplungsverhalten dieser beiden Polymorphismen ist in Tabelle 17 dargestellt. Von 303 Proben trugen 55 sowohl c.496A>G als auch IVS10-15T>C heterozygot. 7 Patienten

waren für beide SNPs homozygot. Entkoppelt war die Information bei 21 Patienten. Die Proben von 20 Patienten waren entweder nur für c.496A>G oder nur für IVS10-15T>C heterozygot. Eine Probe trug nur den SNP c.496A>G homozygot, war hingegen Wildtyp für IVS10-15T>C. Daraus ergibt sich eine Kopplungsfrequenz von 68%.

5.5.4 Korrelation zwischen c.496A>G bzw. IVS10-15T>C und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem Vorliegen von c.496A>G bzw. IVS10-15T>C und Nebenwirkungen im Zusammenhang mit einer 5-FU-haltigen Chemotherapie, wurde Tabelle 18 erstellt. Die beiden SNPs werden aufgrund des gerade beschriebenen gekoppelten Auftretens zusammen betrachtet.

		gesamtes Patientenkollektiv n=276					Mammakarzinom n=89					maligne GI-Tumoren n=184				
		T ⁺	T	Σ	OR [KI]	p	T ⁺	T	Σ	OR [KI]	p	T ⁺	T	Σ	OR [KI]	p
c.496A>G	G/G	3	3	6	2,47 [0,51; 12,00]	0,263	2	2	4	1,78 [0,24; 13,20]	0,569	1	1	2	2,97 [0,21; 42,93]	0,424
	A/G	22	33	55	1,65 [0,89; 3,05]	0,110	6	11	17	0,97 [0,32; 2,97]	0,960	15	22	37	2,03 [0,96; 4,30]	0,066
	A/A	59	146	205			23	41	64			35	104	139		
Σ		84	182	266			31	54	85			51	127	178		
Allelfrequenz		16,7%	10,7%				16,1%	13,9%				16,7%	9,4%			
			12,6%					14,7%					11,5%			
IVS10-15T>C	C/C	3	3	6	2,69 [0,56; 12,95]	0,219	2	2	4	1,83 [0,25; 13,49]	0,555	1	1	2	3,39 [0,24; 47,56]	0,363
	T/C	22	34	56	1,74 [0,94; 3,22]	0,077	6	10	16	1,10 [0,35; 3,40]	0,873	15	24	39	2,12 [1,00; 4,48]	0,050
	T/T	55	148	203			23	42	65			31	105	136		
Σ		80	185	265			31	54	85			47	130	177		
Allelfrequenz		17,5%	10,8%				16,1%	13,0%				18,1%	10,0%			
			12,8%					14,1%					12,1%			

Tabelle 18: Korrelation zwischen c.496A>G bzw. IVS10-15T>C und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv, sowie den Untergruppen „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“

T⁺ = leichte/keine Toxizität; T⁻ = Toxizität °III -°IV

Der SNP c.496A>G kam sowohl im gesamten Patientenkollektiv, als auch für die Tumorentitäten „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“ in der Gruppe „Toxizität °III -°IV“ (T⁺) jeweils häufiger vor, als in der Gruppe „leichte/keine Toxizität“ (T⁻). Eine Ausnahme stellen hierbei heterozygote Träger von c.496A>G mit Mammakarzinom dar. In dieser Subgruppe wurde c.496A>G bei

schweren Nebenwirkungen °III - °IV seltener gefunden, als in der nebenwirkungsarmen Gruppe. Diese Beobachtung hat mit einem p-Wert von 0,960 keine Signifikanz. Berücksichtigt man jedoch auch homozygote Träger von c.496A>G, so wird deutlich, dass auch hier die Tendenz eher in Richtung eines gehäuften Vorliegens des SNP in der nebenwirkungsreichen Gruppe geht. So liegt das Allel c.496A>G mit 16,1 % in der T⁺-Gruppe häufiger vor, als mit 13,9% in der T⁻-Gruppe.

Alle diese Beobachtungen bzgl. c.496A>G hatten bei p-Werten zwischen 0,066 und 0,960 keine Signifikanz. Jedoch waren die p-Werte bei Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes deutlich näher am 5%-Signifikanzniveau, als bei Mammakarzinomen. Vor allem für heterozygote Träger von c.496A>G mit gastrointestinaler Neoplasie sieht man bei einem p-Wert von 0,066 eine deutliche Tendenz in Richtung eines Zusammenhangs zwischen Vorliegen des SNPs und Auftreten von schweren Nebenwirkungen unter 5-FU-Therapie.

Der mit c.496A>G häufig gekoppelt auftretende SNP IVS10-15T>C verhält sich ähnlich. IVS10-15T>C kommt durchweg in der nebenwirkungsreichen Gruppe häufiger vor, als bei Patienten, bei denen unter Chemotherapie mit 5-FU keine oder nur kaum Nebenwirkungen aufgetreten sind. Wiederum sind die Beobachtungen bei p-Werten zwischen 0,050 und 0,873 statistisch nicht signifikant, wobei auch hier im Kollektiv mit malignen gastrointestinalen Tumoren am ehesten das Signifikanzniveau von 5% erreicht wird. Bei Betrachtung der heterozygoten Träger von IVS10-15T>C in dieser Gruppe fällt auf, dass der Polymorphismus in der T⁺-Gruppe mit einem p-Wert von 0,050 deutlich häufiger vorkommt, als in der T⁻-Gruppe, und damit nur knapp nicht signifikant ist.

5.5.5 Korrelation zwischen c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen

Die Ergebnisse der Berechnungen bezüglich einer Assoziation zwischen c.1236G>A und einem Auftreten von starken Nebenwirkungen im Rahmen einer 5-FU-haltigen Chemotherapie sind in Tabelle 19 aufgeführt.

		gesamtes Patientenkollektiv n=276					Mammakarzinom n=89					maligne GI-Tumoren n=184				
		T ⁺	T ⁻	Σ	OR [KI]	p	T ⁺	T ⁻	Σ	OR [KI]	p	T ⁺	T ⁻	Σ	OR [KI]	p
c.1236G>A	A/A	0	0	0			0	0	0			0	0	0		
	G/A	6	5	11	2,59 [0,80; 8,38]	0,114	3	2	5	2,44 [0,41; 14,64]	0,332	3	3	6	2,56 [0,53; 12,44]	0,242
	G/G	84	181	265			32	52	84			50	128	178		
Σ		90	186	276			35	54	89			53	131	184		
Allelfrequenz		3,3%	1,3%				4,3%	1,9%				2,8%	1,1%			
		2,0%				2,8%					1,6%					

Tabelle 19: Korrelation zwischen c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv, sowie den Untergruppen „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“

T⁻ = Toxizität < III; T⁺ = Toxizität III -IV

Der mit einer Allelfrequenz von 2,0% im gesamten Patientenkollektiv eher seltene SNP c.1236G>A konnte trotz Pooling zur Detektierung von Homozygotie nicht in A/A-Konfiguration gefunden werden.

Sowohl im gesamten Patientenkollektiv, wie auch in den Untergruppen „Mammakarzinom“ und „maligne GI-Tumoren“ war c.1236G>A häufiger in der T⁺-Gruppe, als in der T⁻-Gruppe. Bei p-Werten zwischen 0,114 und 0,332 konnte jedoch keine Signifikanz erreicht werden.

5.6 c.1129-5923C>G in Intron 10

Durch die Entdeckung des, eine Insertion in die cDNA bedingenden SNPs c.1129-5923C>G im Intron 10 durch van Kuilenburg et al. 2010, wurden die Analysen bezüglich c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A um die Intronmutation c.1129-5923C>G erweitert. Da der mit c.1129-5923C>G gekoppelte SNP c.1236G>A mitunter im Mittelpunkt der Analysen für diese Arbeit steht, war dies eine sinnvolle Ergänzung.

Es wurde das gesamte Patientenkollektiv dieser Arbeit zusätzlich auf das Vorliegen von c.1129-5923C>G untersucht. Hier wurden insgesamt 11 heterozygote Träger von c.1129-5923C>G detektiert, die ebenfalls c.1236G>A in G/A-Konfiguration trugen. Hierdurch ergibt sich eine 100%ige Kopplung zwischen c.1129-5923C>G und c.1236G>A.

Darüber hinaus wurden die Proben aus einem in der Arbeitsgruppe schon inklusive Analyse bezüglich c.1236G>A vorliegendem Kontrollkollektiv⁶, bei positivem Befund für c.1236G>A zusätzlich auf c.1129-5923C>G untersucht. Bei jeder der Proben mit c.1236G>A wurde ebenfalls die Intronmutation c.1129-5923C>G nachgewiesen. Damit ergibt sich in diesem deutschen Kontrollkollektiv⁶ für c.1129-5923C>G eine für c.1236G>A identische Heterozygotenfrequenz von 3,3% (veröffentlicht in van Kuilenburg, Meijer et al., 2010).

In Abbildung 39 ist die charakteristische Kurve von c.1129-5923C>G ersichtlich, mit der entsprechenden Wildtypkontrolle für Intron 10. Die DHPLC wurde bei 55,8°C durchgeführt.

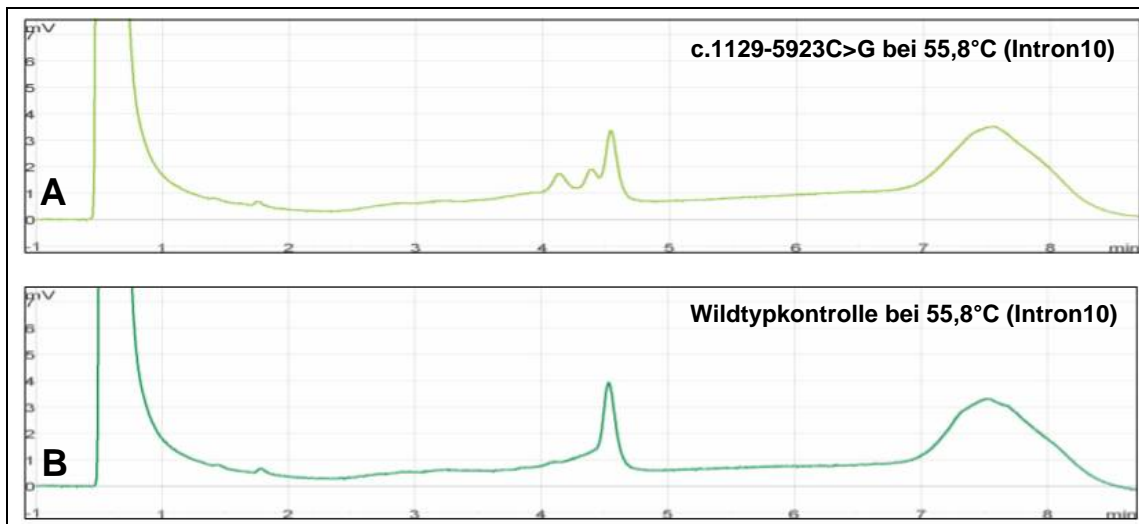


Abbildung 39: Vergleich der DHPLC-Profile des Intron 10 zwischen Wildtypkontrolle (B) und c.1129-5923C>G (A)

5.7 Unbekannte SNPs IVS10-114G>A und IVS10-96A>G

Bei der, zur Analyse des SNPs IVS10-15T>C durchgeführten, DHPLC des PCR-Produkts von Exon 11 mit einem Teil der umgebenen Intronsequenz bei 55°, wurden zusätzlich zwei bis dahin unbekannte Mutationsmuster detektiert. Die in Abbildung 40 gezeigten Veränderungen wurden anschließend sequenziert. Wie in Abbildung 41 ersichtlich lassen sich die Mutationen als IVS10-114G>A und IVS10-96A>G beschreiben. Die im Verlauf ebenfalls dieses

⁶ bestehend aus 453 gesunden Personen. Zu beachten ist, dass es sich hierbei um ein anderes Kontrollkollektiv handelt, als das der übrigen Arbeit, welches 150 Personen umfasst.

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

Mutationsmuster aufweisenden Proben wurden alle zusätzlich sequenziert, um einen vermeintlich vorliegenden, normalerweise ebenfalls bei 55°C sichtbaren SNP IVS10-15T>C nicht zu übersehen.

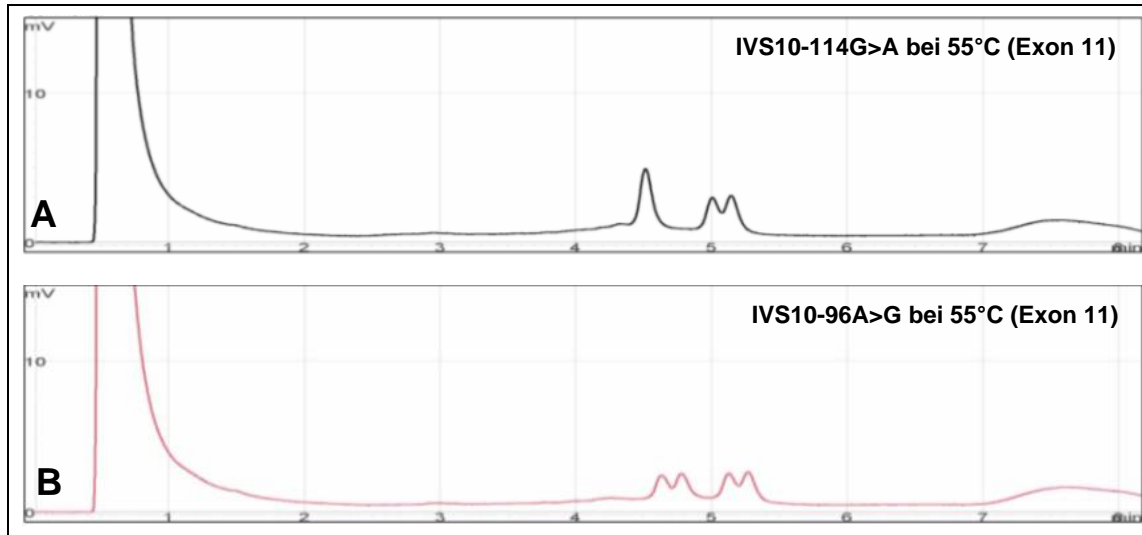


Abbildung 40: DHPLC-Profile der unbekannt SNPs IVS10-114G>A (A) und IVS10-96A>G (B)

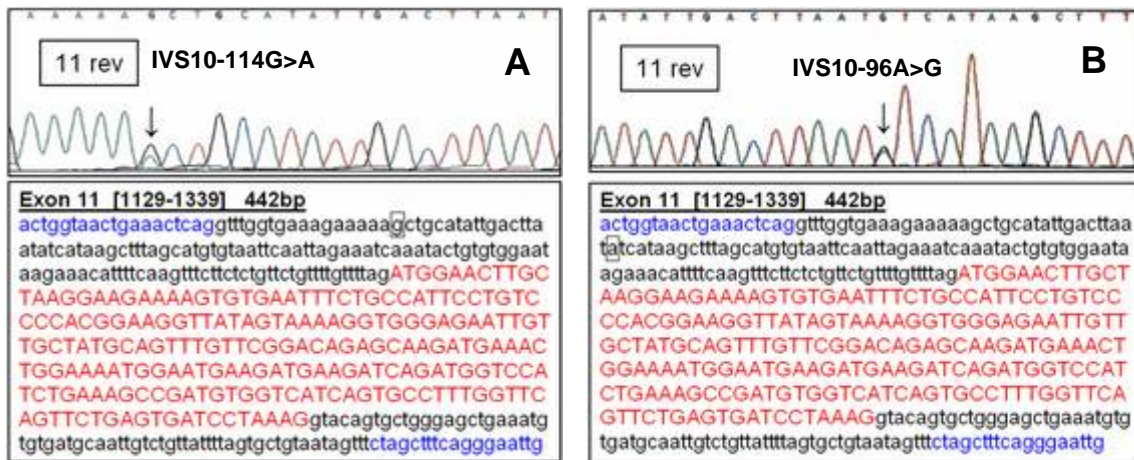


Abbildung 41: Sequenzanalysen der unbekannt SNPs IVS10-114G>A (A) und IVS10-96A>G (B)

Es handelt sich jeweils um die Rückwärtssequenz, die der Einfachheit halber umgedreht wurde.

Die berechneten Heterozygotenfrequenzen, sowie Verteilungen von IVS10-114G>A in der Kontrollgruppe, im Vergleich zu Patienten/-innen mit Mammakarzinom oder malignen gastrointestinalen Tumoren sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

IVS10-96A>G hingegen war nur bei einer einzigen Patientin zu sehen. Diese war an einem Mammakarzinom erkrankt, erhielt jedoch entgegen ursprünglicher Planung doch keine 5-FU-haltige Chemotherapie.

	Kontrollgruppe	Mammakarzinom	maligne GI-Tumoren	Σ
IVS10-114G>A Wildtyp*	132	229	89	450
heterozygot	5	3	1	9
Σ	137	232	90	459
Heterozygotenfrequenz	3,8%	1,3%	1,1%	

Tabelle 20: Kreuztabelle zwischen IVS10-114G>A und Kontrolle bzw. Tumorart

*enthält in der Kontrollgruppe unter Umständen eine vernachlässigbare Anzahl an Homozygoten, die mit der Methodik nicht bestimmt werden konnte

5.8 Nebenwirkungen und Applikationstyp

Die Daten des Patientenkollektivs wurden zusätzlich zu der bereits aufgeführten Auswertung bezüglich des Genotyps, hinsichtlich der Applikationsweise und Nebenwirkungen betrachtet. Wie bereits erläutert, beeinflusst die Art der Verabreichung von 5-FU dessen Nebenwirkungsprofil (vgl. 2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen, S.22).

Die nachfolgenden zwei Kreuztabellen basieren auf den Daten von Tabelle 15. Zum besseren Verständnis der Zuordnung in bestimmte Applikationsgruppen sind im Anhang die einzelnen Chemotherapiepläne aufgeführt.

Um zu ermitteln, ob im gesamten Patientenkollektiv Nebenwirkungen häufiger bei Bolusgabe, oder bei kontinuierlicher Dauerinfusion auftreten, wurde Tabelle 21 erstellt. In die Gruppe „ausschließlich Bolusapplikation/Gabe über 1 h“ wurden nur Personen gezählt, welche 5-FU als Bolus oder über den kurzen Zeitraum von einer Stunde erhalten haben und 5-FU nicht zusätzlich im Rahmen eines Kombinationsschemas auch als Dauerinfusion appliziert bekamen. Verglichen wurden diese Personen mit einer anderen Gruppe, „ausschließlich Dauerinfusion“, bei der ausschließlich Schemata mit kontinuierlicher Dauerinfusion zum Einsatz kamen. Personen mit Kombinationsregimen aus Bolus- und Dauerapplikation, sowie mit oraler oder sonstiger fluoropyrimidinhaltiger Therapie wurden dabei nicht mit einbezogen.

Entsprechend der Daten aus Tabelle 21 ergibt sich, dass in diesem Ausschnitt des Patientenkollektivs, mit 5-FU als reine Bolusapplikation oder als 1-stündige

Infusion, von allen Personen 41,1% Nebenwirkungen °III - °IV entwickelten. Im Gegensatz dazu liegt der Anteil mit starken Nebenwirkungen unter den Personen mit reiner 5-FU-Dauerinfusion nur bei 25,9%.

		Toxizität °III - °IV	leichte/keine Toxizität	Gesamt
Applikationsart	ausschließlich Bolusapplikation/ Gabe über 1 h	39	56	95
	ausschließlich Dauerinfusion	37	106	143
Gesamt		76	162	238

Tabelle 21: Kreuztabelle zwischen Applikationstyp der 5-FU-haltigen Chemotherapie und aufgetretenen Nebenwirkungen im gesamten Patientenkollektiv

OR = 2,00; KI = [1,15; 3,46], p-Wert von 0,014

Unter dem Gesichtspunkt, dass besonders hämatologische Nebenwirkungen unter Bolusgabe häufiger beobachtet wurden als bei kontinuierlicher Dauerinfusion (vgl. 2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen, S.22), wurden die gewonnenen Daten auch diesbezüglich ausgewertet.

		Hämatotoxizität °III - °IV		Gesamt
		ja	nein	
Applikationsart	(u.a.) Bolusapplikation oder Gabe über 1 h	25	5	30
	ausschließlich Dauerinfusion	9	5	14
Gesamt		34	10	44

Tabelle 22: Kreuztabelle zwischen dem Applikationstyp der 5-FU-haltigen Chemotherapie und der aufgetretenen Hämatotoxizität

OR = 2,78; KI = [0,67; 11,56]; p-Wert 0,162

Hämatologische Nebenwirkungen konnten in diesem Ausschnitt des Patientenkollektivs unter Bolusgabe bzw. Infusion über eine Stunde häufiger beobachtet werden, als bei kontinuierlicher Dauerinfusion. Diese Beobachtung war mit einem p-Wert von 0,162 nicht statistisch signifikant.

Zu der Applikationsart „(u.a.) Bolusapplikation/Gabe über 1 h“ wurden Schemata mit ausschließlicher Bolusapplikation gezählt. Unter der Annahme, dass bei Kombinationstherapien die Bolusgabe für das Auftreten derartiger Blutbildungsstörungen ursächlich ist, wurden diese Regime ebenfalls in jene

Gruppe eingestuft. Die Regime mit einer Applikation über eine Stunde wurden ebenfalls dieser Kategorie zugeordnet. In die Kategorie „ausschließlich Dauerinfusion“ wurden die übrigen Chemopläne mit kontinuierlicher Dauerinfusion ohne zusätzliche Bolusgabe eingegliedert.

Aufgrund mangelnder zusätzlicher Daten bezüglich einer Knochenmarks-suppression wurden hierfür die verstorbenen Personen und solche mit ausschließlich kardialer oder neurologischer Toxizität aus Tabelle 15 nicht berücksichtigt.

		ausschließlich Bolusapplikation/ Gabe über 1 h					ausschließlich Dauerinfusion				
		T ⁺	T ⁻	Σ	OR [KI]	p	T ⁺	T ⁻	Σ	OR [KI]	p
c.496A>G	G/G	2	2	4	1,91 [0,26; 14,08]	0,529	1	0	1		
	A/G	8	11	19	1,39 [0,49; 3,95]	0,535	9	17	26	1,73 [0,69; 4,31]	0,238
	A/A	22	42	64			26	85	111		
Σ		32	55	87			36	102	138		
IVS10-15T>C	C/C	2	2	4	1,83 [0,25; 13,49]	0,555	1	0	1		
	T/C	8	11	19	1,33 [0,47; 3,76]	0,596	9	18	27	1,89 [0,76; 4,72]	0,171
	T/T	23	42	65			23	87	110		
Σ		33	55	88			33	105	138		
c.1236G>A	A/A	0	0	0			0	0	0		
	G/A	3	2	5	2,41 [0,40; 14,46]	0,337	3	2	5	4,54 [0,84; 24,51]	0,078
	G/G	33	53	86			34	103	137		
Σ		36	55	91			37	105	142		

Tabelle 23: Korrelation zwischen c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen aufgegliedert nach Applikationsweise

T⁻ = Toxizität < °III; T⁺ = Toxizität °III -°IV

Um ein Vorliegen der SNPs c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A auch in Abhängigkeit von der 5-FU-Applikationsweise auszuwerten, wurden die in Tabelle 23 zusammengefassten Berechnungen durchgeführt. Hierfür wurden die beiden großen Gruppen mit „ausschließlicher Bolusapplikation bzw. Gabe über 1 h“ und „ausschließlicher Dauerinfusion“ gegenübergestellt. Es wurden keine signifikanten Ergebnisse erreicht. Jedoch ergibt sich bei ausschließlicher Dauerinfusion für die Variante c.1236G>A bei Vorliegen eines A/A-Genotyps

eine deutliche Tendenz für das Auftreten von schweren Nebenwirkungen ($p = 0,078$).

5.9 Nebenwirkungen und Alter bzw. Geschlecht

In der Vergangenheit wurden Alter und Geschlecht mit Toxizität unter 5-FU-Therapie in Zusammenhang gebracht. Deshalb erfolgte in dem relativ kleinen Teil des Patientenkollektivs, bestehend aus den 52 Personen mit detailliertem Nebenwirkungsprofil (vgl. Tabelle 15) zusätzlich eine Auswertung bezüglich dieser Faktoren. Da die *Meta-analysis Group of cancer* die Risikofaktoren „weiblich“ und „höheres Alter“ isoliert mit nicht-hämatologischen Nebenwirkungen in Zusammenhang brachte (vgl. *Meta-analysis Group In Cancer, 1998b*), wurden die Daten nicht nur unabhängig von der Nebenwirkungsart betrachtet, sondern auch in hämatologische und nicht-hämatologische Nebenwirkungen unterschieden. Die Berechnungen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

		TOXIZITÄT °III - °IV														
		nicht näher spezifiziert					nicht - hämatologisch					hämatologisch				
		J A	N E I N	Σ	OR [KI]	P	J A	N E I N	Σ	OR [KI]	P	J A	N E I N	Σ	OR [KI]	P
Alter	≥ 65 a	31	57	88	1,18 [0,69; 2,01]	0,542	5	9	14	0,56 [0,16; 1,95]	0,358	10	4	14	1,02 [0,26; 3,95]	0,976
	< 65 a	59	128	187			19	19	38			27	11	38		
Σ		90	185	275			24	28	52			37	15	52		
Geschlecht	w	56	92	148	1,66 [0,997; 2,78]	0,051	13	22	35	0,32 [0,10; 1,06]	0,061	28	7	35	3,56 [1,04; 12,17]	0,043
	m	34	93	127			11	6	17			9	8	17		
Σ		90	185	275			24	28	52			37	15	52		

Tabelle 24: Korrelation zwischen Alter bzw. Geschlecht und Art der Toxizität

Auch wurde berechnet, ob sich geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich einer Korrelation von c.496A>G, IVS10-15T>C bzw. c.1236G>A mit Nebenwirkungen ergeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt. Sowohl für Frauen als auch für Männer ergibt sich ein positiver Zusammenhang hinsichtlich des Vorliegens des jeweiligen SNPs und einer Toxizität, ohne statistische Signifikanz dieser Beobachtung.

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

		FRAUEN n=149					MÄNNER n=127				
		T ⁻	T ⁺	Σ	OR [KI]	P	T ⁻	T ⁺	Σ	OR [KI]	P
c.496A>G	G/G	2	2	4	2,06 [0,29; 14,65]	0,472	1	1	2	3,08 [0,21; 44,78]	0,412
	A/G	14	19	33	1,52 [0,68; 3,36]	0,308	8	14	22	1,76 [0,66; 4,67]	0,254
	A/A	35	72	107			24	74	98		
Σ		51	93	144			33	89	122		
IVS10-15T>C	C/C	2	2	4	2,20 [0,31; 15,59]	0,430	1	1	2	3,48 [0,25; 49,28]	0,358
	T/C	14	16	30	1,93 [0,85; 4,37]	0,114	8	18	26	1,54 [0,59; 4,03]	0,373
	T/T	34	75	109			21	73	94		
Σ		50	93	143			30	92	122		
c.1236G>A	A/A	0	0	0			0	0	0		
	G/A	3	2	5	2,58 [0,44; 14,99]	0,294	3	3	6	2,90 [0,59; 14,19]	0,187
	G/G	53	91	144			31	90	121		
Σ		56	93	149			34	93	127		

Tabelle 25: Korrelation zwischen c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen aufgegliedert nach Geschlecht

T⁻ = Toxizität < °III; T⁺ = Toxizität °III -°IV

6. Diskussion

Im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie wurde der Genotyp eines Patientenkollektivs untersucht, bestehend aus 90 Fällen schwerer fluoropyrimidinbedingter Toxizität und 186, unter Therapie mit 5-FU nebenwirkungsarmen „Kontrollen“. Die statistische Auswertung der mittels DHPLC gewonnenen Daten bezüglich c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A wurde ausgiebig dargelegt. Zudem wurden die Proben bezüglich der mit c.1236G>A gekoppelten Intronmutation c.1129-5923C>G untersucht.

Im Zuge der Analysen wurden zudem die SNPs IVS10-114G>A und IVS10-96A>G, sowie die Spleißmutation IVS12-1G>A entdeckt.

6.1 Bedeutung c.496A>G und IVS10-15T>C

Der SNP c.496A>G wurde in der Vergangenheit mehrmals untersucht. In der Literatur wird die Bedeutung von c.496A>G jedoch im Zusammenhang mit 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen nicht eindeutig klassifiziert. Erstmals wird c.496A>G von van Kuilenburg et al. 2000 beschrieben (vgl. van Kuilenburg, Haasjes et al., 2000). Eine eindeutige Zuordnung von Auswirkungen durch c.496A>G auf das Auftreten von Toxizität ist bis heute nicht gelungen. Dies wäre jedoch für die Planung einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil von großer Bedeutung.

Der infolge von c.496A>G resultierende Aminosäureaustausch Met166Val an höchst konservierter Stelle in der Nähe der Eisen-Schwefel-Cluster lässt eine Unterbrechung des Elektronentransfers vermuten und somit einen Einfluss auf die Aktivität der DPD (vgl. Gross, Ullrich et al., 2003; Mattison, Johnson et al., 2002).

Der SNP c.496A>G wird einerseits mit therapiebedingten Nebenwirkungen in Zusammenhang gebracht (vgl. van Kuilenburg, Haasjes et al., 2000; Gross, Ullrich et al., 2003), kann jedoch andererseits mit einer normalen DPD-Aktivität einhergehen. So beschreiben Seck et al. unter Trägern des G-Allels keine signifikanten Abweichungen von der medianen DPD-Aktivität in einer kaukasischen Kohorte (vgl. Seck, Riemer et al., 2005). Auch Johnson et al.

konnten für heterozygote Träger von c.496A>G normale DPD-Aktivitäten nachweisen (vgl. Johnson, Wang et al., 2002). Im Gegensatz dazu erhielten van Kuilenburg et al. im Falle eines heterozygoten Trägers verminderte DPD-Aktivitäten (vgl. van Kuilenburg, Haasjes et al., 2000). Ein Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten der DPD und dem Auftreten von Nebenwirkungen unter fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie bleibt jedoch letztlich ungeklärt.

Gross et al. konnte in einer Assoziationsstudie für die Variante c.496A>G ein attributales Risiko, schwere therapiebedingte Toxizität zu erleiden, von 56,9% nachweisen. Es wiesen insgesamt über 43% der Patienten mit schweren Nebenwirkungen die Variante c.496A>G auf, während die klassische Spleißmutation IVS14+1G>A nur bei 5,4% zu finden war. Die Verbindung von c.496A>G mit starken Nebenwirkungen wurde besonders in Patienten mit bösartigen gastroösophagealen Tumoren und Brustkrebs beobachtet. Bei Patienten mit bösartigen kolorektalen Tumoren wurde hingegen keine Signifikanz für diese Beobachtung erreicht. (vgl. Gross, Busse et al., 2008)

Der Polymorphismus c.496A>G könnte unter Kaukasiern mit einer eher häufigen Allelfrequenz von ca. 8% in einem gesunden Kontrollkollektiv (n=607) (vgl. Gross, Busse et al., 2008; Seck, Riemer et al., 2005) und bis zu 10,7% unter Tumorpatienten (n=84) (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008) während einer fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapie ein nicht zu vernachlässigender Risikofaktor sein. Zu berücksichtigen sind eventuelle regionale Unterschiede in der Auftretswahrscheinlichkeit von c.496A>G. Kleibl et al. fanden in einer tschechischen Kontrollpopulation sogar eine Allelfrequenz von 14,2% (n = 243) (vgl. Kleibl, Fidlerova et al., 2009). In einer tunesischen Population hingegen lag die Allelfrequenz nur bei 5,7% (n = 106) (vgl. Ben Fredj, Gross et al., 2007). Cho et al. fanden unter 100 gesunden koreanischen Kontrollen kein Allel mit der Variante c.496A>G (vgl. Cho, Park et al., 2007). Unter 21 Patienten mit kolorektalen Neoplasien und 5-FU-assoziiierter Toxizität trat c.496A>G einmalig auf (ibd.) Unter japanischen Probanden war bei 2,2% der Allele c.496A>G nachweisbar (vgl. Maekawa, Saeki et al., 2007).

Die Polymorphismen c.496A>G und IVS10-15T>C treten häufig zusammen auf. Die in dieser Arbeit ermittelte Kopplungsfrequenz von 68% ist identisch mit dem

Ergebnis vorheriger Berechnungen über ein *Linkage Disequilibrium* in derselben Arbeitsgruppe bzgl. eines anderen Kollektivs (vgl. Gross, Busse et al., 2008).

Tabelle 26 ist eine Aufstellung verschiedener Allelfrequenzen von c.496A>G aus unterschiedlichsten Studien, sowie aus dieser Arbeit, in Hinblick auf ein häufigeres Auftreten in Zusammenhang mit schwerer 5-FU-assoziierten

SNP	ALLELFREQUENZ			CHEMOTHERAPIE	
	T ⁺	T ⁻	Σ		
c.496A>G	Gesamtes Patientenkollektiv				
	0,167* (n=84)	0,107* (n=182)	0,126 (n=266)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,110 (A/G) bzw. p=0,263 (G/G)
	Subgruppe: maligne GI-Tumoren				
	0,167* (n=51)	0,094* (n=127)	0,115 (n=178)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,066 (A/G) bzw. p=0,424 (G/G)
	vgl. Gross, Busse et al., 2008				
	0,26** (n=39)	0,08** (n=89)	-	5-FU bzw. Capecitabine	*p(corr)=0,002 *p(corr)=0,001
	vgl. Deenen, Tol et al., 2011				
	0,144§ (n=45§)	0,044§# (n=90§#)	-	Capecitabine	
	vgl. Amstutz, Farese et al., 2009				
	0,125* (n=24)	0,08* (n=87)	0,09 (n=111)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,392
vgl. Schwab, Zanger et al., 2008					
0,093§ (n=54§)	0,133§ (n=30§)	0,107 (n=84§)	5-FU		
vgl. Kleibl, Fidlerova et al., 2009					
0,132§ (n=76§)	0,198§ (n=48§)	0,157§ (n=124§)	5-FU bzw. Capecitabine		
IVS10-15T>C	Gesamtes Patientenkollektiv				
	0,175* (n=80)	0,108* (n=185)	0,128 (n=265)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,077 (T/C) bzw. p=0,219 (C/C)
	Subgruppe: maligne GI-Tumoren				
	0,181* (n=47)	0,100* (n=130)	0,121 (n=177)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,050 (T/C) bzw. p=0,363 (C/C)
	vgl. Amstutz, Farese et al., 2009				
	0,125* (n=24)	0,109* (n=87)	0,113 (n=111)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,797
	vgl. Gross, Busse et al., 2008				
0,24* (n=39)	0,085* (n=89)	-	5-FU bzw. Capecitabine	*p(corr)=0,009	
vgl. Deenen, Tol et al., 2011					
0,163§ (n=43§)	0,120§ (n=100§#)	-	Capecitabine		

Tabelle 26: Allelfrequenzen von c.496A>G bzw. IVS10-15T>C, aufgegliedert nach 5-FU-assoziiierter Toxizitätszuordnung (°III - °IV vs. < °III) im Vergleich mit Literaturangaben

T⁻ = Toxizität < °III; T⁺ = Toxizität °III - °IV; n = Patientenanzahl; §berechnet aus Daten der jeweiligen Quelle; # enthält 8 Patienten mit Toxizität °III - °IV

u.U. ergänzt um den anti-EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Antikörper

Toxizität. Aufgrund des eben angesprochenen gekoppelten Auftretens wird hier auch der ebenfalls untersuchte SNP IVS10-15T>C, in nicht kodierender Region, aufgeführt.

Gross et al. konnten unter deutlicher Signifikanz eine Assoziation zwischen dem Vorliegen von c.496A>G und schwerwiegenden Nebenwirkungen unter fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie bei Patienten/-innen mit Mamma- und gastrointestinalen Karzinomen nachweisen (p=0,002 bzw. 0,001). Aufgrund des gekoppelten Auftretens war auch IVS10-15T>C verbunden mit Toxizität (p=0,009). (vgl. Gross, Busse et al., 2008)

Deenen et al. untersuchten 568 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinomen vor Chemotherapie mit Capecitabine, Oxaliplatin und dem anti-VEGF (*vascular epithelial growth factor*)-Antikörper Bevacizumab

Cetuximab aus der CAIRO2 Studie (vgl. Tol, Koopman et al., 2009) und analysierten im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie die Genotypen verschiedener SNPs im DPYD-Gen im Zusammenhang mit Toxizitätserscheinungen (vgl. Deenen, Tol et al., 2011). Der Fallgruppe wurden davon 45 Patienten mit Toxizität °III - °IV zugeordnet. Für die Kontrollgruppe wurden aus der gesamten Gruppe mit 568 Patienten 100 Individuen randomisiert gezogen. Durch das zufällige „Ziehen“ der Kontrollen aus der Gesamtgruppe der Kohortenstudie ergibt sich die Tatsache, dass in der Kontrollgruppe auch 8 Individuen mit schwerer Toxizität enthalten sind (ibd.) (vgl. Tabelle 26). Auffällig sind die, anhand der in der Studie angegebenen Daten bzgl. c.496A>G berechneten Allelfrequenzen. Während diese in der nebenwirkungsarmen Gruppe nur bei 4,4% lag, hatten in der Toxizitätsgruppe 14,4% der Allele die Veränderung c.496A>G. Deenen et al. beobachteten zudem einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen Diarrhoe °III - °IV und Hand-Fuß-Syndrom °II - °III mit c.496A>G, jedoch mit niedrigem positivem Vorhersagewert (ibd.). Amstutz et al. erhielten kein signifikantes Ergebnis für c.496A>G ($p=0,392$), jedoch war c.496A>G häufiger in der nebenwirkungsreichen Gruppe (vgl. Amstutz, Farese et al., 2009). Schwab et al. erhielten im Gegensatz dazu eine negative Korrelation zwischen c.496A>G und Toxizität. Hier war bei geringer Fallzahl ($n=84$) c.496A>G bei ausgeprägter Toxizität mit einer Allelfrequenz von 9,3% seltener als in der Gruppe mit geringerer Toxizität (13,3%) (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008). Auch Kleibl et al. fanden eine Häufung von c.496A>G in der T⁻-Gruppe (hier 19,8% vs. 13,2% in der T⁺-Gruppe). Solch protektive Effekte wurden besonders für Frauen bezüglich einer Neutropenie oder hämatologischen Nebenwirkungen allgemein beobachtet (vgl. Kleibl, Fidlerova et al., 2009). Für beide Nebenwirkungsgruppen konnte mit p-Werten von 0,03 eine Signifikanz nachgewiesen werden (ibd.).

Mit Ausnahme der letzteren Studien decken sich die Beobachtungen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Auch hier gab es mit Ausnahme der heterozygoten Träger von c.496A>G in der Untergruppe „Mammakarzinom“ stets eine positive Korrelation zwischen dem Vorliegen von c.496A>G und einem Auftreten von schweren Nebenwirkungen. In der Subgruppe „Mammakarzinom“ war die Ausbildung einer schwerwiegenden Toxizität bei

einem A/G-Genotyp seltener als bei Patienten mit zweifachem Vorliegen des A-Allels. Unter Berücksichtigung homozygoter Träger, bei Berechnung der Allelfrequenz, tendiert die Wechselbeziehung jedoch insgesamt auch in der Gruppe „Mammakarzinom“ in Richtung eines gehäuften Antreffens von c.496A>G bei schweren Nebenwirkungen. Im gesamten Patientenkollektiv war unter 266 Patienten/-innen das Auftreten von Toxizität unter fluoropyrimidin-haltiger Chemotherapie bei Vorliegen eines c.496A>G-Allels häufiger als bei Patienten mit zwei A-Allelen ($p = 0,110$). Diese Tendenz wird in der Subgruppe mit malignen GI-Tumoren unter heterozygoten Trägern von c.496A>G mit einem p-Wert von 0,066 deutlicher, ist jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Da Gross et al. für c.496A>G vor allem bei Patienten/-innen mit bösartigen gastroösophagealen Tumoren und Brustkrebs einen Zusammenhang mit schweren Nebenwirkungen beobachten konnten (vgl. Gross, Busse et al., 2008) wurde die Gruppe mit gastrointestinalen Tumoren zusätzlich noch einmal in die Subgruppen „gastroösophageale“ und „kolorektale Tumoren“ aufgegliedert. Jedoch konnte auch in dem Subkollektiv mit gastroösophagealen Tumoren für c.496A>G keine signifikante Assoziation mit ausgeprägter Toxizität gemessen werden.

IVS10-15T>C, eine Punktmutation im Intron, weist keinerlei bekannten Effekt auf die DPD auf und wird dadurch in der Literatur kaum diskutiert, es liegen jedoch umfangreiche Daten vor (vgl. Tabelle 26). Eine Assoziation mit Nebenwirkungen wäre vermutlich auf das gekoppelte Auftreten mit c.496A>G zurück zu führen. Durch diese Kopplung finden sich in Bezug auf eine Assoziation mit Toxizität in dieser Arbeit für IVS10-15T>C ähnliche Ergebnisse wie für c.496A>G. Sowohl in der Untergruppe „Mammakarzinom“, als auch in dem gesamten Patientenkollektiv, wie auch bei malignen gastrointestinalen Tumoren treten betroffene Allele von c.496A>G oder IVS10-15T>C bei beobachteter schwerer Toxizität gehäuft auf. Bezüglich IVS10-15T>C heterozygot getestete Patienten/-innen im gesamten Patientenkollektiv haben eine deutliche Tendenz in Richtung Auftreten schwerer Nebenwirkungen ($p = 0,077$). Entsprechend c.496A>G ist auch für IVS10-15T>C in der Subgruppe „maligne gastrointestinale Tumoren“ die beobachtete Assoziation ausgeprägter und erreicht mit einem p-Wert von 0,050 nur knapp keine statistische Signifikanz.

Zusammenfassend ist eine Assoziation zwischen c.496A>G bzw. IVS10-15T>C mit schweren Nebenwirkungen deutlich an den Allelfrequenzen zu erkennen, wobei der Unterschied jeweils in der Gruppe mit malignem gastrointestinalem Tumor deutlicher besteht, als in der Gruppe mit Mammakarzinom (vgl. Tabelle 18, S.76).

Dies könnte im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Planung der 5-FU-haltigen Chemotherapie bei diesen zwei Gruppen stehen. Während gynäkologische Patientinnen mit den einmal alle 22 Tage applizierten 500 mg/m² des FEC-Schemas oder den an Tag 1 und 8 alle 29 Tage applizierten 600 mg/m² des CMF-Schemas, ein relativ niedrige Dosis 5-FU aufnehmen, erscheinen die im Anhang ersichtlichen Therapiepläne für Personen mit malignen gastrointestinalen Tumoren deutlich intensiver. So werden zum Beispiel im PLF-, OLF- oder Douillard-Schema an den Tagen 1, 8, 15, 22, 29 und 36 jeweils 2000 mg/m² 5-FU appliziert mit Wiederholung an Tag 50. Auch wenn hierbei die Dosis verträglicher über eine kontinuierliche Dauerinfusion und nicht wie bei dem FEC- oder CMF-Schema innerhalb von einer Stunde verabreicht wird, sind die meisten Schemata für gastrointestinale Malignome von höherer Intensität. (vgl. Chemotherapiepläne im Anhang)

Unter dieser Voraussetzung könnte sich die weniger ausgeprägte Häufung der SNPs c.496A>G und IVS10-15T>C in der jeweiligen Toxizitätsgruppe unter den Personen mit Chemotherapie aufgrund eines Mammakarzinoms im Vergleich zu denen mit Therapie wegen eines malignen Tumors im Gastrointestinaltrakt erklären lassen. Eine sich auf das Nebenwirkungsprofil von 5-FU auswirkende Beeinträchtigung der DPD durch die SNPs c.496A>G bzw. IVS10-15T>C könnte sich unter Umständen erst bei intensiven Chemotherapieregimen bemerkbar machen. Dies stünde jedoch im Gegensatz zu der Beobachtung von Gross et al., dass besonders unter Mammakarzinomen bei vorliegendem SNP c.496A>G fluoropyrimidin-assoziierte Nebenwirkungen auftreten (vgl. Gross, Busse et al., 2008).

Das Auftreten von c.496A>G sowie IVS10-15T>C ist zudem in den Tumorgruppen häufiger, als in der Kontrollgruppe, was an den jeweils höheren Heterozygotenfrequenzen von c.496A>G und IVS10-15T>C in den Gruppen „Mammakarzinom“ und „maligne gastrointestinale Tumoren“ zu erkennen ist

(vgl. Tabelle 16, S.75). Der beobachtete Unterschied erreichte jedoch bei p-Werten zwischen 0,107 und 0,490 keine Signifikanz.

6.2 Bedeutung von c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G

Im Falle des SNPs c.1236G>A in Exon 11 handelt es sich um eine stille Mutation (vgl. Seck, Riemer et al., 2005). Es läge die Vermutung nahe, dass sich ohne einen resultierenden Aminosäureaustausch im Enzym (Glu412Glu) (ibid.) durch ein Vorliegen von c.1236G>A kein Zusammenhang mit 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen ergeben kann. Mit einer Allelfrequenz von 0,3% unter Kaukasiern (vgl. Seck, Riemer et al., 2005) schien es sich bei c.1236G>A um eine sehr seltene DPYD-Variante zu handeln. Die beobachtete Häufigkeit von bis zu 3% unter Tumorpatienten (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008) könnte eine Assoziation von c.1236G>A mit einem erhöhten Tumorrisiko vermuten lassen. Allerdings berichten auch neuere Daten ein häufigeres Vorkommen von c.1236G>A. So wurden in gesunden europäischen Populationen Heterozygotenfrequenzen von ca. 3% gefunden (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010). Zu beachten sind auch regionale Unterschiede. In einer tunesischen Population lag die Allelfrequenz von c.1236G>A bei 0,9% (vgl. Ben Fredj, Gross et al., 2007). Unter 121 koreanischen (vgl. Cho, Park et al., 2007), sowie 341 japanischen Probanden (vgl. Maekawa, Saeki et al., 2007) konnte c.1236G>A offensichtlich überhaupt gar nicht nachgewiesen werden.

Die Mutation c.1236G>A trat in der Literatur bereits mehrmals im Kontext mit Toxizität unter fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapien in Erscheinung. Eine Zuordnung ist jedoch besonders in Anbetracht des eher seltenen Auftretens statistisch schwierig und demnach widersprüchlich. Auch wurde vergleichbar zu Trägern anderer SNPs, die im Verdacht stehen, Nebenwirkungen durch 5-FU zu begünstigen, bei einem Träger des A-Allels eine normale DPD-Aktivität gemessen (vgl. Seck, Riemer et al., 2005).

Studien, welche mitunter einen Zusammenhang von c.1236G>A mit 5-FU-Toxizität untersuchen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Kleibl et al. fanden abweichend von allen übrigen Ergebnissen eine Häufung von c.1236G>A in der nebenwirkungsarmen Gruppe (vgl. Kleibl, Fidlerova et

al., 2009). Alle anderen Daten weisen auf eine positive Korrelation zwischen dem Vorliegen von c.1236G>A und dem Auftreten von Nebenwirkungen hin.

Schwab et. al. fanden in einer multizentrischen klinischen Studie bei Patienten mit schwerwiegenden Nebenwirkungen unter 5-FU-Monotherapie von c.1236G>A zwar größere Allelfrequenzen (3,7%) als in der nebenwirkungs-

ärmeren Gruppe (2,8%)

(vgl. Schwab, Zanger et al., 2008). Der DPYD

wird insgesamt hier jedoch generell eine untergeordnete Rolle bei

der Entstehung von 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen zuge-

sprochen (ibd.).

Auch in einer weiteren Studie trat c.1236G>A

in der Gruppe mit ausgeprägter Toxizität bevorzugt auf (vgl. Gross,

Busse et al., 2008).

Deenen et al. konnten sogar eine deutliche,

nur knapp nicht statistisch signifikante Häufung

(p=0,08) von c.1236G>A mit Toxizität

beobachten (vgl. Deenen, Tol et al., 2011).

SNP	ALLELFREQUENZ			CHEMOTHERAPIE	
	T ⁺	T ⁻	Σ		
c.1236G>A ↑ Glu412Glu in Exon 11	Gesamtes Patientenkollektiv				
	0,033* (n=90)	0,013* (n=186)	0,020 (n=276)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,114
	vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010 [~]				
	0,045* [§] (n=66)	0,011* [§] (n=137)	0,022 [§] (n=203)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,033 ⁺
	vgl. Schwab, Zanger et al., 2008				
	0,037 [§] (n=82 [§])	0,028 [§] (n=390 [§])	0,030 [§] (n=472 [§])	5-FU	
	vgl. Amstutz, Farese et al., 2009				
	0,104* (n=24)	0,017* (n=87)	0,036 (n=111)	5-FU bzw. Capecitabine	*p=0,013
	vgl. Gross, Busse et al., 2008				
	0,03 (n=39)	0,01 (n=89)	-	5-FU bzw. Capecitabine	
vgl. Deenen, Tol et al., 2011					
0,078 ^{§*} (n=45 [§])	0,025 ^{§##} (n=100 ^{§##})	-	Capecitabine	*p=0,08	
vgl. Kleibl, Fidlerova et al., 2009					
0,013 [§] (n=76 [§])	0,021 [§] (n=48 [§])	0,016 [§] (n=124 [§])	5-FU bzw. Capecitabine		

Tabelle 27: Allelfrequenzen von c.1236G>A, aufgegliedert nach 5-FU-assoziiierter Toxizitätszuordnung im Vergleich mit Literaturangaben

T⁻ = Toxizität < °III; T⁺ = Toxizität °III - °IV; n = Patientenzahl; [§]berechnet aus Daten der jeweiligen Quelle; [#]enthält 8 Patienten mit Toxizität °III - °IV; ⁺bezogen auf die Heterozygotenfrequenzen; [~]Zwischenstand dieser Studie

beobachten (vgl. Deenen, Tol et al., 2011).

Amstutz et al. fanden sogar eine starke Assoziation zwischen dem Auftreten von c.1236G>A und der Ausbildung von 5-FU-bedingten Nebenwirkungen

(p = 0,013). Beschrieben ist c.1236G>A zudem als Bestandteil eines, mit Toxizität assoziierten Haplotyps, neben der stillen Mutation c.1236G>A

bestehend aus den Intronmutationen IVS5+18G>A, IVS6+139G>A und IVS9-51T>G. Von sieben Patienten mit diesem Haplotyp erlitten 4 schwerwiegende

Toxizitätserscheinungen (57%). Der einzige homozygote Träger erlitt zudem einen tödlichen Ausgang einer 5-FU-Toxizität. Bei den Trägern dieses Haplotyps konnten keine Spleißmutationen oder Veränderungen mit resultierendem Aminosäureaustausch nachgewiesen werden. (vgl. Amstutz, Farese et al., 2009)

Van Kuilenburg et al. entdeckten die tiefe Intronmutation c.1129-5923C>G in Intron 10. Die dadurch entstehende Donor-Spleißstelle führt zur Insertion eines 44 bp großen Fragments von Intron 10 in die reife mRNA, wodurch sich durch die Verschiebung des Leserahmens ein frühzeitiges Stoppcodon bildet. Durch das bisher in 100% der Fälle beobachtete gekoppelte Auftreten von c.1129-5923C>G zusammen mit dem von Amstutz et al. beschriebenen Haplotyp c.483+18G>A (IVS5+18G>A), c.959-51T>G (IVS9-51T>G), c.680+139G>A (IVS6+139G>A) und c.1236G>A lässt sich somit die oben beschriebene Assoziation dieses Haplotyps mit Nebenwirkungen erklären. (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010)

Auch die bisherige unsichere Datenlage, das Toxizitätsrisiko des Polymorphismus c.1236G>A betreffend, bekommt durch die Entdeckung von c.1129-5923C>G und das jeweilige gekoppelte Auftreten eine deutliche Wendung. Eine Assoziation der stillen Mutation c.1236G>A mit 5-FU-bedingten Nebenwirkungen ist folglich durch die gleichzeitig vorliegende Intronmutation c.1129-5923C>G und den konsekutiven alternativen Spleißvorgang zu erklären. Da der SNP c.1236G>A auch bei den Analysen dieser Arbeit zu 100% gekoppelt mit der Intronmutation c.1129-5923C>G auftrat, können diese beiden Veränderungen gemeinsam betrachtet werden und die Ergebnisse für c.1236G>A (vgl. 5.5.5 Korrelation zwischen c.1236G>A und 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen, S.77) 1 zu 1 auf c.1129-5923C>G übertragen werden.

Der durch van Kuilenburg et al. bzgl. c.1236G>A veröffentlichte Zwischenstand der Daten dieser Arbeit bzgl. c.1236G>A ergab eine signifikante Häufung des G/A-Genotyps in der nebenwirkungsreichen Patientengruppe mit einer Heterozygotenfrequenz von 9,1% (6 von 66), im Vergleich zu 2,2% (3 von 137) bei geringen Nebenwirkungen ($p = 0,033$) (veröffentlicht in van Kuilenburg, Meijer et al., 2010).

Bis zur Beendigung der Laborarbeiten bzw. Archivrecherche im Dezember 2010 waren zu den insgesamt 9 Patientenproben mit c.1129-5923C>G bzw. c.1236G>A weitere 2 Proben hinzugekommen. Diese Patienten/-innen hatten die 5-FU-haltige Chemotherapie ohne verstärkte Nebenwirkungen überstanden. Damit erlitten nicht mehr 6 von 9 Personen mit diesen Veränderungen unter fluoropyrimidinhaltiger Therapie schwere Nebenwirkungen, sondern 6 aus 11. Bei dieser geringen Zahl wirkt sich diese Änderung auf die Berechnungen so aus, dass bei gleicher Tendenz nun kein statistisch signifikanter Unterschied mehr erkennbar ist ($p = 0,114$). Bei insgesamt nur 11 Trägern von c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G, ist eine mathematische Schätzung hinsichtlich der Zufälligkeit dieser Beobachtung äußerst unpräzise, was an dem breiten Konfidenzintervall zu erkennen ist (KI = [0,80; 8,38]). Die Ergebnisse für diese beiden gekoppelten Mutationen ergaben sowohl im gesamten Patientenkollektiv, wie auch in den Subgruppen „Mammakarzinom“ und „maligne gastrointestinale Tumoren“ bei fehlender Signifikanz durchweg eine begünstigende Tendenz bzgl. eines Auftretens von Toxizität ($p = 0,114$, $p = 0,332$ bzw. $p = 0,242$). Die Varianten c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G kamen unter den insgesamt 276 Patienten mit einer Allelfrequenz von 2,0% vor. Vergleichbare Daten in der Literatur sind abgesehen von der genannten Studie von van Kuilenburg et al. aus dem Jahr 2010 von Largiadèr et al. beschrieben. Hier lag die Allelfrequenz für c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G bei 2,7% unter einem Kollektiv aus Krebspatienten (vgl. Largiadèr, Amstutz et al., 2010, zitiert nach Amstutz, Froehlich et al., 2011). Unter einem niederländischen bzw. deutschen, gesunden Kontrollkollektiv ergaben sich Heterozygotenfrequenzen von 2,6% bzw. 3,3% (Allelfrequenzen von 1,3%⁷ bzw. 1,7%⁷) (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010).

Aufgrund dieses relativ seltenen Vorkommens der c.1236G>A-Variante sind signifikante Ergebnisse hinsichtlich eines Risikos für Toxizität nur mit sehr großen Fallzahlen zu erwarten. Eine erst kürzlich publizierte Meta-Analyse von Meulendijks et al. mit insgesamt 7365 Patienten bestätigte im Dezember 2015, also nach Abschluss dieser Dissertation, tatsächlich eine Assoziation zwischen fluoropyrimidinbedingter Toxizität \geq Grad 3 (*adjusted relativ risk* RR = 1,59 [1,29 - 1,97], $p < 0,0001$) und dem Vorliegen von c.1236G>A bzw. des

⁷ berechnet anhand des Hardy-Weinberg-Gesetzes

korrespondierenden Haplotyps. Dabei lag das *adjusted* RR für hämatologische und gastrointestinale Toxizität jeweils bei etwa 2, mit ebenfalls hoher Signifikanz ($p = 0,013$; $p < 0,0001$;). (vgl. Meulendijks, Henricks et al., 2015)

Die in dieser Studie beobachteten 5 heterozygoten Träger der Mutationen c.1129-5923C>G bzw. c.1236G>A, welche die 5-FU-haltige Chemotherapie gut vertrugen, stehen nicht im Widerspruch mit der Annahme eines ursächlichen Zusammenhangs mit schweren Nebenwirkungen bei Trägern dieser Mutationen. Diese Träger haben einerseits ein ausgleichendes intaktes zweites Allel. Die Intronmutation c.1129-5923C>G führt andererseits während des Spleißvorganges nicht immer zu der Insertion von 44 bp in die reife mRNA. Auch ausgehend von dem Allel mit c.1129-5923C>G können mRNA-Moleküle mit korrekter Sequenz entstehen (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010). Dies erklärt auch das im Gegensatz zu trunkierenden DPYD-Mutationen in der Meta-Analyse durch Meulendijks et al. bezüglich c.1236G>A berechnete, niedrige relative Risiko RR von 1,59 (vgl. Meulendijks, Henricks et al., 2015).

Die Untersuchung von c.1129-5923C>G bzw. c.1236G>A hinsichtlich einer Häufung in einer Tumorgruppe waren statistisch nicht signifikant. Die Heterozygotenfrequenzen waren in der Gruppe „Mammakarzinom“ höher ($p = 0,503$) und in der Gruppe „maligne gastrointestinale Tumoren“ niedriger ($p = 0,215$), als in der Kontrollgruppe.

6.3 Bedeutung der bisher unbekanntenen Mutationen IVS12-1G>A, IVS10-114G>A und IVS10-96A>G

Bei der neu detektierten Mutation IVS12-1G>A an kryptischer Spleißstelle mit teilweise resultierender Deletion von Exon 13 bzw. Exon 13 und Exon 12 in der cDNA handelt es sich um eine Veränderung, welche als ursächlich für die aufgetretene schwere Toxizität des betroffenen Patienten bezeichnet werden kann.

Die neu beschriebenen Punktmutationen IVS10-114G>A und IVS10-96A>G (vgl. 5.7 Unbekannte SNPs IVS10-114G>A und IVS10-96A>G, S.79) liegen in beträchtlichem Abstand vom eigentlichen Exon 11 und der betreffenden

Spleißstelle. Zudem handelt es sich bei dem SNP IVS10-114G>A mit einer Heterozygotenfrequenz zwischen 3,8% (Kontrollgruppe) und 1,1% („maligne gastrointestinale Tumoren“) um eine eher seltene Mutation. Der SNP IVS10-96A>G kam sogar unter 459 analysierten Proben nur einmalig vor. Weder IVS10-114G>A noch IVS10-96A>G wurden in der Toxizitätsgruppe gefunden. Folglich sind diese Mutationen höchstwahrscheinlich, insbesondere aufgrund ihrer Lage im Genom, von untergeordneter Bedeutung was die Kausalität für 5-FU-bedingte Nebenwirkungen betrifft.

6.4 Risikofaktoren Alter, Geschlecht und Applikationsweise

Die *Meta-analysis Group In Cancer* beschreibt höheres Lebensalter und weibliches Geschlecht besonders im Zusammenhang mit nicht-hämatologischen Nebenwirkungen als Risikofaktor (vgl. 2.1.5 Nebenwirkungen, S.19; *Meta-analysis Group In Cancer*, 1998b).

Ein Zusammenhang mit Nebenwirkungen konnte in dieser Arbeit für den Faktor „Alter“ nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu erreicht die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass eher Frauen Nebenwirkungen unter 5-FU-haltiger Therapie bekommen als Männer allgemein für Nebenwirkungen °III - °IV mit einem p-Wert von 0,051 nur knapp keine Signifikanz. Jedoch verhält sich die Geschlechtsverteilung bei nicht-hämatologischen Nebenwirkungen entgegengesetzt und ist hierbei mit einem p-Wert von 0,061 fast signifikant. Hier manifestieren sich bei Frauen nur in 37,1% der Fälle Nebenwirkungen nicht-hämatologischer Art. Bei Männern hingegen sind 64,7% der Nebenwirkungen °III - °IV nicht-hämatologischer Natur. Unter den hämatologischen schweren Nebenwirkungen sieht man eine statistisch signifikante Häufung bei Frauen ($p = 0,043$).

In Hinblick auf die Applikationsweise von 5-Fluorouracil decken sich die Ergebnisse mit denen in Kapitel 2.1.8 Intravenöse Applikationsweisen von 5-Fluorouracil (S.22) erläuterten Beobachtungen der Literatur.

Im gesamten Patientenkollektiv konnte eine statistisch signifikante Häufung an starken Nebenwirkungen unter Bolusapplikation bzw. rascher Infusion über eine Stunde gegenüber einer kontinuierlichen Dauerinfusion beobachtet werden ($p = 0,014$).

In dem Teil des Patientenkollektivs mit genau dokumentierten starken Nebenwirkungen war eine hämatologische Toxizität nach Bolusapplikation bzw. schneller Infusion über eine Stunde häufiger als nach kontinuierlicher Dauerinfusion über mehrere Stunden ($p = 0,162$).

7. Zusammenfassung

Auch heutzutage ist 5-Fluorouracil, über 50 Jahre nach seiner Entdeckung, noch immer ein bedeutendes Mittel für die Chemotherapie vieler solider Tumoren. Neben der Therapie des Mammakarzinoms hat es besonders bei Darm- und Magenkarzinomen einen hohen Stellenwert. Die Weiterentwicklung zu Capecitabine, einem oralen Chemotherapeutikum, ist besonders in Hinblick auf Patientenkomfort und Lebensqualität von entscheidender Bedeutung. Ein großes Problem bleibt jedoch die hohe Nebenwirkungsrate, sowohl bei der intravenösen Applikation, als auch bei oraler Einnahme. Die Unterschiede der auftretenden, durch 5-FU ausgelösten Toxizitätserscheinungen sind einerseits bedingt durch die an sich in der Normalbevölkerung zu findenden Varianz der DPD-Aktivität. Zusätzlich kommen Varianten im DPYD-Gen hinzu, welche Einfluss auf das Enzym haben können. Seltene Polymorphismen, welche in der Literatur als Risikovarianten eingestuft werden, sind c.1679T>G (vgl. Morel, Boisdron-Celle et al., 2006; van Kuilenburg, Dobritzsch et al., 2002), sowie c.2846A>T (vgl. Loganayagam, Arenas-Hernandez et al., 2010; van Kuilenburg, Dobritzsch et al., 2002). Beide SNPs führen durch einen Basenaustausch an kodierenden Stellen zu einem Aminosäureaustausch in der DPD (Ile560Ser bzw. Asp949Val) (ibd.). Desweiteren wurde die Spleißmutation IVS14+1G>A mit einer Allelfrequenz von 0,91% als Risikofaktor für die Ausbildung 5-FU-assoziiertes Nebenwirkungen identifiziert (vgl. van Kuilenburg, Muller, 2001). Neben diesen drei eher seltenen Faktoren wurde zudem ein häufigerer Haplotyp nachgewiesen, bestehend aus den drei Intronmutationen IVS5+18G>A, IVS9-51T>G, IVS6+139G>A, sowie der stillen Mutation c.1236G>A (vgl. Amstutz, Farese et al., 2009) gekoppelt mit c.1129-5923C>G (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010), einer tiefen Intronmutation. Hiervon steht c.1129-5923C>G durch Generierung einer kryptischen Donor-Spleißstelle mit konsekutiver Leserasterverschiebung und frühzeitigem Stoppcodon kausal im Zusammenhang mit der beobachteten Assoziation dieses Haplotyps mit dem Auftreten von schwerer Toxizität unter fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie (ibd.).

In dieser Arbeit wurde neben c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G, die Bedeutung von c.496A>G, einer Variante in Exon 6 an hoch konservierter Stelle mit resultierendem Aminosäureaustausch Met166Val (vgl. Gross, Busse et al., 2008) untersucht, die häufig gekoppelt mit IVS10-15T>C im Intron 10 auftritt.

Es konnte gezeigt werden, dass Träger der Polymorphismen c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G eine deutliche Tendenz in

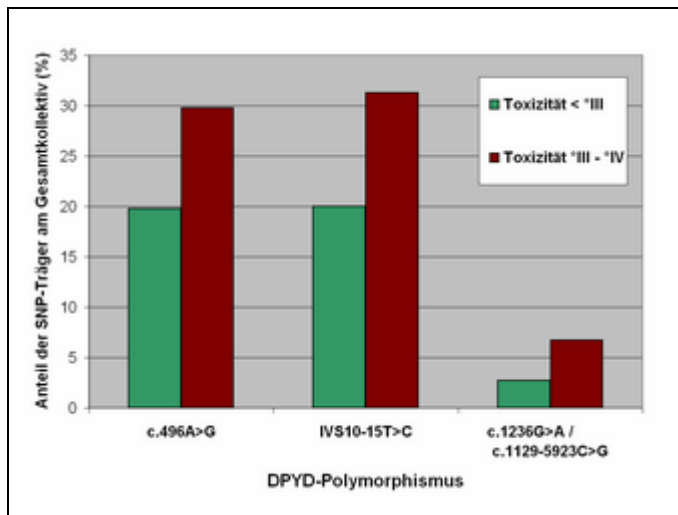


Abbildung 42: Vorkommen der DPYD-Varianten c.496A>G, IVS10-15T>C und c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G im Patientenkollektiv in Hinblick auf Toxizitätserscheinungen unter 5-FU-haltiger Chemotherapie

Richtung Ausbildung von Nebenwirkungen unter 5-FU-haltiger Chemotherapie zeigen (vgl. Abbildung 42). Eine Assoziation zwischen den genannten SNPs und schweren 5-FU-bedingten Nebenwirkungen konnte bei einem Signifikanzniveau von 5% mit dieser Arbeit nicht bewiesen werden.

Doch wurde dadurch ein Zusammenhang auch nicht ausgeschlossen. Für die Untergruppe „maligne gastrointestinale Tumoren“

war eine Assoziation von IVS10-15T>C ($p = 0,050$ für den T/C-Genotyp) und c.496A>G ($p = 0,066$ für den A/G-Genotyp) mit schweren 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen nur knapp nicht statistisch signifikant.

Für die Verbesserung der Sicherheit einer antineoplastischen Therapie mit 5-FU ist die Identifizierung von potentiell toxisch reagierenden Patienten/-innen von entscheidender Bedeutung. Durch ein solches Screening vor zytotoxischer Therapie könnte durch eine Dosisreduktion ein wichtiger Schritt in Richtung einer individuell angepassten Dosierung erfolgen. Schwierig ist die Bewertung bekannter Mutationen im DPYD-Gen. Eine Zuordnung der klassischen Spleißmutationen an den unveränderlichen Spleißerkennungssequenzen im Bereich der Exon-Intron-Grenzen, wie IVS14+1G>A (vgl. Vreken, van Kuilenburg et al., 1996; Wie, McLeod et al., 1996) und IVS11+1G>T (vgl. van

Kuilenburg, Meinsma et al., 2005), sowie die in dieser Arbeit entdeckte Spleißmutation IVS12-1G>A, erscheint in Anbetracht der resultierenden großräumigen Veränderungen in der reifen mRNA mit zum Teil resultierendem Funktionsverlust der DPD eindeutig. Mit der Intronmutation c.1129-5923C>G wurde zudem eine Mutation außerhalb der Spleißstellen beschrieben, welche nachweislich ebenfalls Einfluss auf den Spleißvorgang nimmt und zu der Insertion eines 44 bp großen Fragments in die reife mRNA mit konsekutivem frühzeitigem Stoppcodon führt (vgl. van Kuilenburg, Meijer et al., 2010). Der vermeintliche Einfluss von c.1129-5923C>G auf die Enzymfunktion, sowie die Tatsache der beschriebenen 100%igen Kopplung lässt auch eine eindeutige Zuordnung des in dieser Arbeit analysierten Polymorphismus c.1236G>A zu, wenngleich die Einordnung einer genetischen Veränderung hinsichtlich ihres toxischen Potenzials mit Hilfe der resultierenden Enzymaktivität nicht unproblematisch ist. Denn möglicherweise steht die DPD-Aktivität im peripheren Blut nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten von schweren Nebenwirkungen (vgl. Etienne, Lagrange et al., 1994; Di Paolo, Danesi et al., 2001). Van Kuilenburg et al. beschreiben allerdings für niedrige DPD-Aktivitäten ein statistisch signifikantes, im Durchschnitt etwa 2-fach schnelleres Auftreten von Nebenwirkungen als in der Kontrollgruppe mit normaler Enzymfunktion (vgl. van Kuilenburg, Haasjes et al., 2000). Das Anhalten der aufgetretenen Toxizitätserscheinungen unterschied sich hier jedoch nicht und dauerte ungefähr 20 Tage (ibd.).

In einer kürzlich publizierten Meta-Analyse von Meulendijks et al. (n = 7365) konnte eine Assoziation zwischen fluoropyrimidinbedingter Toxizität \geq Grad 3 (*adjusted relative risk* RR = 1,59 [1,29 - 1,97], p < 0,0001) und dem Vorliegen von c.1236G>A bzw. des korrespondierenden Haplotyps bestätigt werden (vgl. Meulendijks, Henricks et al., 2015).

Alles in allem sollte c.1129-5923C>G respektive c.1236G>A ähnliche Konsequenzen auf die Wahl einer Chemotherapie haben, wie IVS14+1G>A. Besonders für diese klassische Spleißmutation der DPYD, die eine eindeutige Rolle im Zusammenhang mit 5-FU-assoziierten Nebenwirkungen spielt, jedoch aufgrund ihres zwar mit einer Heterozygotenfrequenz von bis zu 1,8% (vgl. van Kuilenburg, Muller et al., 2001) für eine Spleißmutation recht häufigen,

insgesamt jedoch eher seltenen Vorkommens nur einen Teil der Toxizitätsfälle erklären kann (vgl. Gross, Busse et al., 2008), gibt es in der Literatur konkrete Vorschläge bezüglich der Planung einer antineoplastischen Therapie. In Frage kommt generell nach Identifizierung durch Toxizität besonders gefährdeter Patienten eine Reduktion der 5-FU-Dosis bzw. eine Änderung der Applikationsweise, bis hin zu einer Umstellung auf eine fluoropyrimidinfreie, alternative Chemotherapie. Es gilt hierbei einerseits zwischen einer inadäquaten Chemotherapie mit konsekutiver Progression der Erkrankung und andererseits dem Risiko starker Nebenwirkungen abzuwägen. Durch eine toxizitätsassoziierte erhöhte Hospitalisationsrate und -dauer entstehen nicht nur wirtschaftliche Nachteile, es sinken auch die Lebensqualität und der Therapieerfolg der Betroffenen.

Deenen et al. untersuchten die nötige Dosisreduktion im Laufe einer Therapie mit Capecitabine, kombiniert mit Oxaliplatin und Bevacizumab ± Cetuximab, um eine sichere Chemotherapie zu gewährleisten. Hier benötigten Träger des IVS14+1G>A Allels durchschnittlich eine Reduktion um bis zu 50%. (vgl. Deenen, Tol et al., 2011)

Gamelin et al. beschrieben in einer multizentrischen Studie genau wie solch eine Dosisreduktion erfolgen kann. Zudem wurden die Unterschiede zwischen den Toxizitätsreaktionen bei Dosisberechnung anhand der Körperoberfläche und bei Dosisermittlung durch primäre, entsprechend einer wöchentlichen Plasmakonzentrationsmessung von 5-FU durchgeführten Dosisanpassung ermittelt. Durch individuell angepasste Dosierungen konnte hier ein positiver Effekt erzielt werden. (vgl. Gamelin, Delva et al., 2008)

Krych et al. beschreiben auf Grundlage pharmakokinetischer Untersuchungen eine Art Provokationstest für DPD-defiziente Patienten, um eine akzeptable 5-FU-Dosis zu ermitteln. Basis hierfür ist die Tatsache, dass die beobachteten Halbwertszeiten und die Clearance bei partiell DPD-defizienten Patienten bei niedrigen 5-FU-Dosierungen mit weniger als 500 mg 5-FU noch normwertig sind. Ausgehend von einem Grenzbereich ab Dosen von 500 mg kann durch kleinschrittige Steigerungen ein Verdacht auf eine teilweise DPD-Defizienz verifiziert werden. Dies ist auch für partiell DPD-defiziente Patienten sicher durchzuführen. Der vorgeschlagene pharmakokinetische Test erfolgt mit einer 5-FU-Bolusgabe von 300 mg/m². Nach Messung der Halbwertszeit, Clearance

und „AUC“ (*area under the concentration-time curve*) wird entsprechend weiterverfahren. (vgl. Krych, Heinemann et al., 2002)

Blasco et al. konnten an dem Fallbeispiel einer heterozygoten Trägerin von IVS14+1G>A mit Mammakarzinom einprägsam darlegen, welchen Einfluss die Applikation von Fluoropyrimidinen auf die Ausprägung der beobachteten Nebenwirkungen hat. Die 34-jährige Patientin erlitt unter Capecitabine (1200 mg/m² 2x tgl.) eine Toxizität °III - °IV und musste bereits am Tag 16 der Therapie stationär aufgenommen werden. Aufgrund des nun erfolgten Nachweises der Exon 14-Skipping Mutation wurde Capecitabine abgesetzt. Bei Progression der Erkrankung wurde trotz der beschriebenen Toxizität mit einer kontinuierlichen 5-FU-Infusion begonnen, zunächst mit 225 mg/m²/d. Auch hier wurden regelmäßige Plasmakonzentrationsbestimmungen durchgeführt. Nach Ausbleiben schwerer Nebenwirkungen wurde die Dosis langsam gesteigert. Trotz der durch IVS14+1G>A vorliegenden partiellen DPD-Defizienz wurden bis zu 600 mg/m²/d toleriert. Die Patientin konnte im Gegensatz zu der oralen Therapie mit dem 5-FU-*Prodrug* Capecitabine nicht nur eine kontinuierliche Therapie mit 5-FU tolerieren, sondern war bereits 2 Jahre zuvor bei 6 Zyklen FEC trotz der vorliegenden, damals noch nicht diagnostizierten Spleißmutation IVS14+1G>A bezüglich Nebenwirkungen unauffällig gewesen. (vgl. Blasco, Boisdron-Celle et al., 2008)

Im Gegensatz dazu entschieden sich Volk et al. bei Progression eines metastasierten Kolonkarzinoms im Falle eines Patienten mit hereditärer partieller DPD-Defizienz nach Ausbildung einer schwerwiegenden 5-FU-assoziierten Toxizität mit konsekutivem, bedingt durch pulmonale Komplikationen längerem Aufenthalt auf Intensivstation, für die Durchführung einer fluoropyrimidinfreien Chemotherapie (vgl. Volk, Reinke et al., 2001). An diesem Beispiel wird sowohl die individuelle Problematik sichtbar, denn aufgrund der schwerwiegenden Komplikationen durch die Chemotherapie mit 5-FU war eine zeitnahe Weiterführung der antineoplastischen Therapie nicht möglich, was vermeintlich zur Tumorprogression führte. Auf der anderen Seite lässt der durch die starke Toxizität bedingte längerfristige Intensivaufenthalt den hohen Kostenfaktor vermuten.

Im Gegensatz zu c.1236G>A bzw. c.1129-5923C>G bleibt die Bedeutung von c.496A>G bei widersprüchlicher Datenlage weiter fraglich. Doch besonders in Hinblick auf das eher häufige Vorkommen dieses Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von bis zu 10,7% unter Tumorpatienten (vgl. Schwab, Zanger et al., 2008) wäre die Unterschätzung seines toxischen Potenzials ungünstig. Es liegt die Vermutung nahe, dass c.496A>G je nach Tumorart und demnach vermutlich abhängig von dem applizierten Chemotherapieschema eine unterschiedliche Bedeutung zukommt. Diese Beobachtung in dieser Arbeit deckt sich mit einer früheren Studie, bei der eine Assoziation von c.496A>G mit 5-FU-bedingten Nebenwirkungen abhängig von der Tumorentität beobachtet wurde (vgl. Gross, Busse et al., 2008).

Einerseits wäre es sinnvoll, bei noch größerer Fallzahl den Zusammenhang von c.496A>G weiter zu untersuchen, um den Beweis bei einem Signifikanzniveau von 5% erbringen zu können. Andererseits stellt sich die Frage, ob nicht in der modernen Zeit auch im Falle der 5-FU-Dosisberechnung ein Schritt in Richtung einer zunehmend individualisierten Medizin gegangen werden könnte. In anderen Bereichen, z.B. bei der antibiotischen Therapie mit Vancomycin oder Gentamycin, sind Messungen der Arzneimittel-Plasmaspiegel bis zu einem Mal am Tag in höchstem Maße üblich. Ein engmaschiges Monitoring der Plasmaspiegelkonzentration von 5-FU während einer antineoplastischen Therapie, vergleichbar mit dem oben beschriebenen Vorgehen von Gamelin et al. (vgl. Gamelin, Delva et al., 2008), erscheint auch bei Vorliegen von c.496A>G verhältnismäßig, bei Hochrisikovarianten wie z.B. IVS14+1G>A, oder c.1129-5923C>G sogar als obligat. Es sind genügend Varianten des DPYD-Gens nachgewiesen, die ein prätherapeutisches Screening rechtfertigen. Hierbei wäre c.496A>G ohne großen Mehraufwand zusätzlich detektierbar.

Eine Dosisanpassung während einer 5-FU-haltigen Chemotherapie bei DPD-Defizienz respektive bei Vorliegen eines DPYD-Risikopolymorphismus könnte durch ein Monitoring der 5-FU-Plasmaspiegel erfolgen, ähnlich einer pharmakologischen Therapie bei Nierenversagen, bei der primär die Dosisanpassung des Medikaments entsprechend der Nierenfunktion im Vordergrund steht und nicht zwingend ein kompletter Verzicht.

Literaturverzeichnis

A

Aktories K, Unger C

Mittel zur Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie

In: „Allgemeine und spezielle Pharmakotherapie und Toxikologie“, Aktories K, Förstermann U, Hoffmann F, Starke K (Hrsg.), Elsevier Urban & Fischer, München, 2005, 9.Auflage, 921 - 959

Aktories K, Unger C

Mittel zur Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie

In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Aktories K, Förstermann U, Hoffmann F, Starke K (Hrsg.), Elsevier Urban & Fischer, München, 2013, 11.Auflage, 884 – 954

Amstutz U, Farese S, Aebi S, Largiad CR (2009) Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment. *Pharmacogenomics* 10:931-944

Amstutz U, Froehlich TK, Largiad CR (2011) Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* 12:1321-1336

Applied Biosystems, Electrophoresis, Foster City, 2011

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/dna-sequencing-fragment-analysis/overview-of-dna-sequencing/electrophoresis.html> (05.02.2011)

Applied Biosystems, Sequencing Chemistries, Foster City, 2011

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/dna-sequencing-fragment-analysis/overview-of-dna-sequencing/sequencing-chemistries.html> (05.02.2011)

Applied Biosystems, Support/Techtools, Foster City, 2011

<http://www.appliedbiosystems.com/support/techtools/pcropt/> (08.02.2011)

Aschele C, Sobrero A, Faderan MA, Bertino JR (1992) Novel mechanism(s) of resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules. *Cancer Res.* 52:1855-1864

B

Ben Fredj R, Gross E, Ben Ahmed S, Hassine H, Saguem S (2009) The dihydrouracil/uracil ratio in plasma, clinical and genetic analysis for screening of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Pathol.Biol.(Paris)* 57:470-476

Ben Fredj R, Gross E, Chouchen L, B'Chir F, Ben Ahmed S, Neubauer S, Kiechle M, Saguem S (2007) Mutational spectrum of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) in the Tunisian population. *Comptes Rendus Biologies* 330:764-769

Blasco H, Boisdron-Celle M, Bougnoux P, Calais G, Tournamille J, Ciccolini J, Autret-Leca E, Le Guellec C (2008) A well-tolerated 5-FU-based treatment subsequent to severe capecitabine-induced toxicity in a DPD-deficient patient. *Br J Clin Pharmacol* 65:966-970

Blum JL (2001) The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncologist*. 6:56-64

Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, LoRusso PM, Kuter I, Vogel C, Osterwalder B, Burger HU, Brown CS, Griffin T (1999) Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 17:485-493

Braumann D, Mainzer K, Günzl C, Lewerenz B (1990) Myokardinfarkte im Rahmen einer 5-Fluorouracil-Therapie. *Onkologie* 13:465-467

Buselmaier W, Gholamali T
Humangenetik
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, 4. Auflage

C

Cho HJ, Park YS, Kang WK, Kim JW, Lee SY (2007) Thymidylate synthase (TYMS) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) polymorphisms in the Korean population for prediction of 5-fluorouracil-associated toxicity. *Ther. Drug Monit.* 29(2):190-6

Chu E, Sartorelli AC
Cancer Chemotherapy
In: „Basic and Clinical Pharmacology“, Katzung BG, Masters SB, Trevor, AJ (Hrsg.), McGraw-Hill Companies, New York-Chicago-San Francisco, 2009, 11. Auflage, 935 - 962

Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer JC, Duffaud F, Richard K, Blanquicett C, Milano G, Blesius A, Durand A, Seitz JF, Favre R, Lacarelle B (2006) A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther.Drug Monit.* 28:678-685

Clark DP, Pazdernik NJ
Molekulare Biotechnologie, Grundlagen und Anwendungen
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, 1. Auflage

Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, Mcleod HL (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 10:217-223

D

Daher GC, Harris BE, Diasio RB (1990) Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. *Pharmacology & Therapeutics* 48:189-222

Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, Guchelaar HJ, Smits PHM, Beijnen JH, Punt CJA, Schellens JHM, Cats A (2011) Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in DPYD and Toxicity and Efficacy of Capecitabine in Advanced Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 17:3455-3468

Di Paolo A, Danesi R, Falcone A, Cionini L, Vannozzi F, Masi G, Allegrini G, Mini E, Bocci G, Conte PF, Del Tacca M (2001) Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann.Oncol.* 12:1301-1306

Diasio RB (2001) Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-FU pharmacology. *Oncology (Williston.Park)* 15:21-26

Dobritzsch D, Ricagno S, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y (2002) Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with NADPH and 5-iodouracil. Implications for mechanism of inhibition and electron transfer. *J.Biol.Chem.* 277:13155-13166

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355:1041-1047

E

Eastern Cooperative Oncology Group, Common Toxicity Criteria, 2002
<http://ecog.dfci.harvard.edu/general/ctc.pdf> (10.02.2011)

Eiermann W, Bauerfeind I, Hanusch CA, Has Müller S, Kahlert S, Kaiser C, Keim S, Mosner M, Oberlechner E, Paepke S, Raab G, Salat C
Primär systemische Therapie
In: „MANUAL, Mammakarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge“, Bauerfeind I (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag, München-Wien-New York, 2009, 12. Auflage, 143 - 152

Ejlertsen B, Mouridsen HT, Jensen MB, Andersen J, Andersson M, Kamby C, Knoop AS (2010) Cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil; oral cyclophosphamide; levamisole; or no adjuvant therapy for patients with high-risk, premenopausal breast cancer. *Cancer* 116:2081-2089

Engelhardt M, Berger D, Mertelsmann R (Hrsg.)
„Das Blaue Buch, Chemotherapie-Manual Hämatologie und Onkologie“,
Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, 3. Auflage

Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N,
Schneider M, Demard F, Milano G (1994) Population study of dihydropyrimidine
dehydrogenase in cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 12:2248-2253

Executive Committee of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (1980)
Increased breast-cancer recurrence rate after adjuvant therapy with levamisole.
A preliminary report. *Lancet* 2:824-827

F

Ferenčik M, Rovenský J, Mat'ha V, Herold M
Immunmodulation: Möglichkeit zur Regelung des Immunsystems
In: „Kompendium der Immunologie, Grundlagen und Klinik“, Ferenčik M,
Rovenský J, Mat'ha V, Herold M, Springer-Verlag, Wien, 2006, 265 - 298

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM
GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC
CancerBase No. 10, International Agency for Research on Cancer, Lyon,
France, 2010
<http://globocan.iarc.fr> (24.02.2011)

Figer A, Nissan A, Shani A, Borovick R, Stiener M, Baras M, Freund HR, Sulkes
A, Stojadinovic A, Peretz T (2011) Mature Results of a Prospective Randomized
Trial Comparing 5-Fluorouracil with Leucovorin to 5-Fluorouracil with
Levamisole as Adjuvant Therapy of Stage II and III Colorectal Cancer- The
Israel Cooperative Oncology Group (ICOG) Study. *J Cancer* 2:177-185

Fleming R, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renee N, Schneider M, Demard F
(1992) Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in
peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer
patients. *Cancer Res.* 52:2899-2902

Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR, Horwitz J, Vaitkevicius VK (1980)
Pharmacokinetics of 5-fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and
by slow infusion. *Cancer Res.* 40:2223-2228

Friis T, Engel AM, Klein BM, Rygaard J, Houen G (2005) Levamisole inhibits
angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. *Angiogenesis* 8:25-34

G

Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J (1999) Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *17*(4), 1105-1110
Ref Type: Generic

Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, Dorval E, Piot G, Morel A, Boisdron-Celle M (2008) Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* *26*:2099-2105

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Levi F (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* *18*:136-147

Grem JL (1997) Systemic treatment options in advanced colorectal cancer: perspectives on combination 5-fluorouracil plus leucovorin. *Semin.Oncol.* *24*:S18

Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, Kiechle M, Lordick F, Meindl A (2008) Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS.One.* *3*:e4003

Gross E, Seck K, Kiechle M (2002) Mutationen im Dihydropyrimidindehydrogenase-Gen als Ursache von 5-Fluorouracil-Intoleranz. *Zentralabl Gynakol* *124*:574,579

Gross E, Ullrich T, Seck K, Mueller V, de Wit M, von Schilling C, Meindl A, Schmitt M, Kiechle M (2003) Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Hum.Mutat.* *22*:498

H

Harris BE, Song RL, He YJ, Soong SJ, Diasio RB (1988) Circadian rhythm of rat liver dihydropyrimidine dehydrogenase. Possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy. *Biochem.Pharmacol.* *37*:4759-4762

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB (1987) Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res.* *47*:2203-2206

Heinemann V, Engel J, Gross M, Kleespies A, Kolligs F, Kopp R, Michl G, Moosmann N, Schalhorn A, Stintzing S, Tympner C, Wagner A, Rosenberg R
Kolonkarzinom
In: „MANUAL, Gastrointestinale Tumoren“, Bruns CJ (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag, München-Wien-New York, 2010, 8. Auflage, 139 - 185

Hodson EM, Willis NS and Craig JC (2008) Non-corticosteroid treatment for nephrotic syndrome in children. Cochrane Database Syst Rev. 1469-493X (Electronic)

Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz, 2007, 59
http://www.roche.com/de/rochea_z.pdf (15.02.2011)

Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK (1993) High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. Nucleic Acids Res. 21:1061-1066

J

Jäger E, Bernhard HF, Klein OF, Wachter BF, Theiss FF, Dippold WF, Meyer zum Buschenfelde KH FAU - Knuth, Knuth A (1995) Combination 5-fluorouracil (FU), folinic acid (FA), and alpha-interferon 2B in advanced gastric cancer: results of a phase II trial. Ann.Oncol. 6(2):153-6

Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB (1999) Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase- deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. Clin.Cancer Res. 5:2006-2011

Johnson MR, Wang K, Diasio RB (2002) Profound dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency resulting from a novel compound heterozygote genotype. Clin.Cancer Res. 8:768-774

Johnston PG, Kaye S (2001) Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. Anticancer Drugs 12:639-646

K

Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Bilek M, Bouskova K, Sevcik J, Novotny J (2009) Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. Neoplasma 56:303-316

Krych M, Heinemann V, Schalhorn A (2002) Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil bei Patienten mit normaler DPD Aktivität und bei Patienten mit partiellem und totalem DPD Defekt. TZM NEWS. 3: 1-4

Köhne C-H, Vanhoefer U, Hossfeld K-D, Höffken K, Seeber S (2002) Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit 5-FU/Folinsäure und Irinotecan. Dtsch Arztebl 99: A 292-294 [Heft 5]

L

Largiadèr CR, Amstutz U, Froehlich TK et al. (2010) The dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity: a classic reborn? Presented at: *CSHL Meeting on Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. Cold Spring Harbor, NY, USA 17 – 20 November 2010 (zitiert nach Amstutz, Froehlich et al., 2011)

Loganayagam A, Arenas-Hernandez M, Fairbanks L, Ross P, Sanderson J, Marinaki A (2010) The contribution of deleterious DPYD gene sequence variants to fluoropyrimidine toxicity in British cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:403-406

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat.Rev.Cancer* 3:330-338

Lottspeich F, Engels JW

Bioanalytik

Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006, 2. Auflage

Lu Z, Zhang R, Diasio RB (1993) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5- fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* 53:5433-5438

M

Maekawa K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Kurose K, Kaniwa N, Kawamoto M, Kamatani N, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Muto M, Doi T, Ohtsu A, Yoshida T, Matsumura Y, Saijo N, Sawada J (2007) Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. *J Hum Genet* 52:804-819

Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, Renee N, Formento JL, Francoual M, Milano G (2007) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Br.J.Clin.Pharmacol.*

Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB (2004) Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-13C-uracil breath test. *Clin.Cancer Res.* 10:2652-2658

Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB (2006) Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin.Cancer Res.* 12:5491-5495

Mattison LK, Johnson MR, Diasio RB (2002) A comparative analysis of translated dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA; conservation of functional domains and relevance to genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* 12:133-144

Meta-analysis Group In Cancer (1998a) Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *Meta-analysis Group In Cancer. J.Clin.Oncol.* 16:301-308

Meta-analysis Group In Cancer (1998b) Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *Meta-Analysis Group In Cancer. Journal of Clinical Oncology* 16:3537-3541

Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, Largiadè CR, Jennings BA, Marinaki AM, Sanderson JD, Kleibl Z, Kleiblova P, Schwab M, Zanger UM, Palles C, Tomlinson I, Gross E, van Kuilenburg AB, Punt CJ, Koopman M, Beijnen JH, Cats A, Schellens JH (2015) Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 16(16):1639-50

Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H (1998) Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur.J.Cancer* 34:1274-1281

Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, Gamelin E (2006) Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol.Cancer Ther.* 5:2895-2904

Mülhardt C

Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, 6. Auflage

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350

N

Nelson D, Cox M

Lehninger Biochemie

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009, 4. Auflage

O

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP (1982) Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649-655

P

Park JG, Collins J, Gazdar A, Allegra C, Steinberg S, Greene R, Kramer BS (1988) Enhancement of fluorinated pyrimidine-induced cytotoxicity by leucovorin in human colorectal carcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 80(19):1560-4

Preanalytix GmbH, PAXgene™ Blood RNA Kit Handbook, Hombrechtikon, Schweiz, 2008, Version 2
<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=103693> (08.02.2011)

Porsin B, Formento JL, Filipinski E, Etienne MC, Francoual M, Renée N, Magné N, Lévi F, Milano G (2003) Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *European Journal of Cancer* 39:822-828

R

Raida M, Schwabe W, Hausler P, van Kuilenburg ABP, Van Gennip AH, Behnke D, Hoffken K (2001) Prevalence of a common point mutation in the Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clinical Cancer Research* 7:2832-2839

Reinacher-Schick A, Arnold D, Trarbach T, Ridwelski K, Bruch HP, Kirchner T, Kubicka S, Schmoll HJ (2010) Adjuvant therapy in colon cancer. *Onkologie* 33 Suppl 4:2-7

Renneberg R
Biotechnologie für Einsteiger
Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2007, 2. Auflage

Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland, 2010
http://www.rki.de/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/Lokalisationen__Tabellen/C50,templateId=raw,property=publicationFile.xls/C50.xls
(24.02.2010)

Ruß A
Arzneimittel pocket
Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald, 2010, 16. Auflage

S

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74:5463-5467

Sarasep Inc., General Description: DNASep™, Sarasep, Inc., San Jose, CA, USA

Schnackerz KD, Dobritsch D, Lindqvist Y, Cook PF (2004) Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron–sulfur clusters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1701:61-74

Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Blievernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M (2008) Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J.Clin.Oncol.* 26:2131-2138

Seck K, Riemer S, Kates R, Ullrich T, Lutz V, Harbeck N, Schmitt M, Kiechle M, Diasio R, Gross E (2005) Analysis of the DPYD Gene Implicated in 5-Fluorouracil Catabolism in a Cohort of Caucasian Individuals. *Clinical Cancer Research* 11:5886-5892

Sharma S, Saltz LB (2000) Oral Chemotherapeutic Agents for Colorectal Cancer. *The Oncologist* 5:99-107

Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, Novotny PJ, Poon MA, O'Connell MJ, Loprinzi CL (2002) Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* 20:1491-1498

Strahlmann R, Lode H

Antibiotika und Chemotherapeutika – antiinfektiöse Therapie

In: „Allgemeine und spezielle Pharmakotherapie und Toxikologie“, Aktories K, Förstermann U, Hoffmann F, Starke K (Hrsg.), Elsevier Urban & Fischer, München, 2005, 9.Auflage, 781 - 919

T

Takai S, Fernandez-Salguero P, Kimura S, Gonzalez FJ, Yamada K (1994) Assignment of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) to chromosome region 1p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24:613-614

Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual, Waltham, USA, 2008

<http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>
(09.02.2011)

Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers G, Schrama G, Erdkamp F, Vos A, van Groeningen C, Sinnige H, Richel D, Voest E, Dijkstra J, Vink-Börger M, Antonini N, Mol L, van Krieken J, Dalesio O, Punt C (2009) Chemotherapy, Bevacizumab, and Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 360:563-572

Transgenomic, An Introduction to the Transgenomic WAVE[®] DNA Fragment Analysis System, WAVE[®] User Handbook, 1-3 – 1-14
Omaha, USA, 1999

Transgenomic, Application Note 110, Omaha, USA, 2000
<http://www.transgenomic.com/lib/an/612010.pdf> (06.02.2011)

Transgenomic, Application Note 107, Omaha, USA, 2000
<http://www.transgenomic.com/lib/an/612007.pdf> (06.02.2011)

Transgenomic, Application Note 104, Omaha, USA, 2000
<http://www.transgenomic.com/lib/an/612004.pdf> (06.02.2011)

Transgenomic, Application Note 112, Omaha, USA, 2000
<http://www.transgenomic.com/lib/an/612012.pdf> (06.02.2011)

V

van Kuilenburg ABP, Dobritsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJM, Maropoulos GD, Hein GD, Kalhoff H, Kirk JM, Baaske H, Aukett A, Duley JA, Ward KP, Lindqvist Y, Van Gennip AH (2002) Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochemical Journal* 364:157-163

van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, Maring JG, Vreken P, Van Gennip AH (2000) Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene. *Clinical Cancer Research* 6:4705-4712

van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, Meinsma R, Schmid V, Dobritsch D, Hennekam RC, Mannens MM, Kiechle M, Etienne-Grimaldi MC, Klumpen HJ, Maring JG, Derleyn VA, Maartense E, Milano G, Vijzelaar R, Gross E (2010) Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum.Genet.* 128:529-538

van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH (2002a) High prevalence of the IVS14+1G > A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 12:555-558

van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH (2002b) Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: High prevalence of the IVS14+1G > A mutation. *International Journal of Cancer* 101:253-258

van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zonnenberg BA, Zoetekouw L, Baas F, Matsuda K, Tamaki N, Van Gennip AH (2003) Dihydropyrimidinase deficiency and severe 5-fluorouracil toxicity. *Clin.Cancer Res.* 9:4363-4367

van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Beke E, Bobba B, Boffi P, Enns GM, Witt DR, Dobritzsch D (2005) Identification of three novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with altered pre-mRNA splicing or protein function. *Biol.Chem.* 386:319-324

van Kuilenburg ABP, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, Baas F, Richel DJ, Van Gennip AH (2001) Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: Frequency of the common IVS14+1G > A mutation causing DPD deficiency. *Clinical Cancer Research* 7:1149-1153

van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, Tromp A, Veltman PCJ, Van Gennip AH (2000) Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clinical Chemistry* 46:9-17

van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NGGM, Bakker HD, Meinsma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, Smeitink JAM, Kayserili H, Apak MY, Christensen E, Holopainen I, Pulkki K, Riva D, Botteon G, Holme E, Tulinius R, Kleijer WJ, Beemer FA, Duran M, Niezen-Koning KE, Smit GPA, Jakobs C, Smit LME, Moog U, Spaapen LJM, Van Gennip AH (1999) Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Human Genetics* 104:1-9

Volk J, Reinke F, van Kuilenburg ABP, Van Gennip AH, Schlichting C, Ganser A, Schöffski P (2001) Safe administration of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed in a DPD-deficient patient with metastatic colon cancer. *Annals of Oncology* 12:569-571

Vreken P, van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Smit GPA, Bakker HD, De Abreu RA, Van Gennip AH (1996) A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 19:645-654

W

Wang TL, Diaz LA, Jr., Romans K, Bardelli A, Saha S, Galizia G, Choti M, Donehower R, Parmigiani G, Shih I, Iacobuzio-Donahue C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Velculescu VE (2004) Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:3089-3094

Wei X, Elizondo G, Sapone A, Mcleod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ (1998) Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 51:391-400

Wei X, Mcleod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P (1996) Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J.Clin.Invest* 98:610-615

Weitz J, Schalhorn A, Kadmon M, Krempl R, Büchler MW
Kolon- und Rektumkarzinom

In: „Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie – Pathogenese – Grundprinzipien der Therapie“, Hiddemann W, Bartram C (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010, 2. Auflage, 848 – 897

Y

Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, Lin K, McBride OW, Podschun B, Schnackerz KD, Gonzalez FJ (1994) cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J.Biol.Chem.* 269:23192-23196

Z

Zhou ZW, Wang GQ, Wan dS, Lu ZH, Chen YB, Li S, Chen G, Pan ZZ (2007) The dihydrouracil/uracil ratios in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Chemotherapy* 53:127-131

Danksagung

Frau Prof. Dr. Marion Kiechle danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

Ganz herzlich möchte ich meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Eva Groß, aus der klinischen Forschungsabteilung für Tumorgenetik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit danken. Die sehr persönliche Betreuung während meiner Laborarbeiten, sowie die Ratschläge während der restlichen Phase meiner Promotion, waren mir stets eine sehr große Hilfe. Zudem sorgte ihr persönliches Interesse an meinem Werdegang immer für eine sehr angenehme Atmosphäre. Vielen herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Auch meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl, Leitung gynäkologische Tumorgenetik, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Er fand bei jedem Treffen die richtigen motivierenden Worte. Ich bedanke mich ganz herzlich für die Obhut.

Dem Laborteam, damals bestehend aus Steffi, Heide, Tanja und Marco, sowie der Doktorandin Juliane, möchte ich für die Unterstützung bei der Erlernung der Labormethoden, sowie für die vielen hilfreichen Tipps danken! Es war mir stets eine Freude viele Stunden im Labor mit so netten Menschen verbringen zu dürfen. Auch mit meinen medizinischen Doktorandenkolleginnen Sandra, Christina und Anna war es sehr schön, den Arbeitsplatz zu teilen. Schade, dass wir so oft so unterschiedliche Zeiten hatten. Ein Dank auch an Markus, der es geschafft hat, mich innerhalb kürzester Zeit einzuarbeiten.

Auch den Mitarbeitern der Chemoeinheit und Tagesklinik der III. medizinischen Klinik mit den zuständigen ärztlichen Kollegen, sowie den Ärzten der Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Gewinnung von Studienteilnehmern und Blutabnahmen. Ein großer Dank geht auch an die Patienten, die in so schwieriger Lebensphase der Wissenschaft so positiv gegenüber stehen.

Herr Bernhard Haller, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar, ermöglichte mir die statistische Auswertung meiner Daten. Vielen Dank für die professionelle Hilfe.

In besonderer Weise danke ich meinen Eltern, Manfred und Elisabeth Schmid, die mich schon immer aus ganzem Herzen unterstützen und stets an meiner Seite sind. Sie haben mich immer motiviert und ermutigt, wodurch vieles leichter wird.

Meinem lieben Ehemann Rafael verdanke ich die Fertigstellung meiner Doktorarbeit. Er hat niemals aufgehört mich zu ermutigen nicht aufzugeben und hat mir stets den Rücken freigehalten.

ECOG Common Toxicity Criteria (vgl. Eastern Cooperative Oncology Group, Common Toxicity Criteria, 2002)					
Blutbild		1	2	3	4
Leukopenie	G/l	3,0 – 3,9	2,0 – 2,9	1,0 – 1,9	< 1,0
Thrombozytopenie	G/l	75,0 – normal	50,0 – 74,9	25,0 – 49,9	< 25,0
Anämie	Hb in [g/dl]	10,0 – normal	8,0 – 10,0	6,5–7,9	< 6,5
Neutropenie	x 10 ³ /µl	1,5 – 1,9	1,0 – 1,4	0,5 – 0,9	< 0,5
Leber		1	2	3	4
Billirubin		-----	< 1,5 x N	1,5 – 3,0 x N	> 3,0 x N
Transaminasen (GOT, GPT)		2,5 x N	2,6 – 5,0 x N	5,1 – 20,0 x N	> 20,0 x N
GI-Trakt		1	2	3	4
Übelkeit	ausreichend Nahrungsaufnahme möglich	Nahrungsaufnahme deutlich vermindert	keine signifikante Nahrungsaufnahme	----	
Erbrechen	1 x in 24 h	2 – 5 x in 24 h	6 – 10 x in 24 h	> 10 x in 24 h oder parenterale Unterstützung nötig	
Diarrhoe	Zunahme von 2 – 3 Stuhlgängen/d im Vergleich zu vorher	Zunahme von 4 – 6 Stuhlgängen/d nächstlicher Stuhlgang oder mäßige Bauchkrämpfe	Zunahme von 7 – 9 Stuhlgängen/d Inkontinenz oder schwere Bauchkrämpfe	Zunahme von > 10 Stuhlgängen/d blutige Diarrhoe oder parenterale Unterstützung nötig	
Mukositis/Stomatitis	schmerzlose Ulzerationen Erythem oder geringfügige Schmerzhaftigkeit	schmerzhafes Erythem Ödem oder Ulcus Nahrungsaufnahme möglich	schmerzhafes Erythem Ödem oder Ulcus Nahrungsaufnahme nicht möglich	parenterale oder enterale Unterstützung nötig	
Hautveränderungen	1	2	3	4	
	vereinzelte Maculae/Papulae Erythem asymptomatisch	vereinzelte Maculae/Papulae Erythem mit Juckreiz oder anderen assoziierten Symptomen	generalisierter symptomatischer Ausschlag mit Maculae, Papulae oder Vesiculae	exfoliative oder ulzerierende Dermatitis	
Alopezie	1	2	3	4	
	milder Haarverlust	ausgeprägter oder vollständiger Haarverlust	----	----	
Neuropathie	1	2	3	4	
	milde Parästhesien Verlust von Sehnenreflexen	milder oder mäßiger Verlust der Sensorik	starke(r) Verlust der Sensorik/Parästhesien Beeinträchtigung der Funktion	----	

Hand-Fuß-Syndrom (vgl. Blum, Jones et al., 1999)			
1	2	3	4
Taubheit Dysästhesie/Parästhesie Kribbeln schmerzlose(s) Schwellung oder Erythem keine Beeinträchtigung	schmerzhafes Erythem mit Schwellung mit Beeinträchtigung im Alltag	feuchte Desquamation Ulzerationen Blasenbildung starke Schmerzen mit ausgeprägter Beeinträchtigung	----

ECOG Performance Status ("ECOG") (vgl. Oken, Creech et al., 1982)					
0	1	2	3	4	5
uneingeschränkte Aktivität asymptomatisch	nur leichte Arbeit (z.B. Hausarbeit) möglich symptomatisch	selbstversorgend nicht bettlägerig weniger als 50% der Tageszeit ruhebedürftig leichte Arbeit unmöglich	Selbstversorgung nur begrenzt möglich mehr als 50% der Tageszeit ruhebedürftig	völlig pflegebedürftig bettlägerig	Tod

Chemoschemata*

Bolusapplikation:

Mayo		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22
Leukovorin	20 mg/m ²	Bolus	v v v v v v			
5-FU	425 mg/m ²	Bolus	v v v v v v			

Wiederholung: d29

Machover		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22
Leukovorin	200 mg/m ²	Bolus	v v v v v v			
5-FU	400 mg/m ²	Bolus	v v v v v v			

Wiederholung: d29

	für GI-Tumoren
	für Mammakarzinom
↓	Bestrahlung
v	Bolus
	Pumpe
	Infusion über 1-2h
	p.o. Tablette
	Mehrtagespumpe läuft bis zu diesem Tag
→	

Applikation über 1h:

CMF		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22
Cyclophosphamid	500 mg/m ²	1 h				
Methotrexat	40 mg/m ²	Bolus	v	v		
5-FU	600 mg/m ²	1 h				

Wiederholung: d29

FEC		Infusions-dauer	d1	d8	d15
Cyclophosphamid	500 mg/m ²	1 h			
Epirubicin	100 mg/m ²	Bolus	v		
5-FU	500 mg/m ²	1 h			

Wiederholung: d22

kontinuierliche Dauerinfusion:

PLF		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29	d36	d43
Cisplatin	50 mg/m ²	1 h							
Leukovorin	500 mg/m ²	2 h							
5-FU	2000 mg/m ²	24h							

Wiederholung: d50

OLF		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29	d36	d43
Oxaliplatin	85 mg/m ²	2 h							
Leukovorin	500 mg/m ²	2 h							
5-FU	2000 mg/m ²	24h							

Wiederholung: d50

Irinotecan/5-FU/FA (Douillard - AIO)		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29	d36	d43
Irinotecan	180 mg/m ²	1,5 h							
Leukovorin	500 mg/m ²	2 h							
5-FU	2000 mg/m ²	24h							

Wiederholung: d50

* entsprechend dem jeweiligen Therapieplan der behandelnden Klinik; Darstellung angelehnt an CD zu Engelhardt, Berger et al., 2010

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

Ardalan		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29	d36	d43
Leukovorin	500 mg/m ²	2 h							
5-FU	2000 mg/m ²	24h							

Wiederholung: d50

Cisplatin/5-FU		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22
Cisplatin	100 mg/m ²	1 h				
5-FU	1000 mg/m ²	24 h				

Wiederholung: d29

FUFOX		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29
Oxaliplatin	50 mg/m ²	2 h					
Leukovorin	500 mg/m ²	2 h					
5-FU	2000 mg/m ²	24h					

Wiederholung: d36

Bolusapplikation und Dauerinfusion:

CAO/ARO/AIO-04 Studie (Kontrollarm)		Infusions-dauer	d1	d8	d15	d22	d29	d36
Radiotherapie	1,8 Gy							
5-FU	1000 mg/m ²	24 h						

O P E R A T I O N

5-FU	500 mg/m ²	Bolus	v	v	v	v	v	v													
------	-----------------------	-------	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Wiederholung: d29 (4 Kurse)

FOLFOX 4		Infusions-dauer	d1	d8
Oxaliplatin	85 mg/m ²	2 h		
Leukovorin	200 mg/m ²	2 h		
5-FU	400 mg/m ²	Bolus	v	v
5-FU	600 mg/m ²	22 h		

Wiederholung: d15

FOLFOX 6		Infusions-dauer	d1	d8
Oxaliplatin	85 mg/m ²	2 h		
Leukovorin	400 mg/m ²	2 h		
5-FU	400 mg/m ²	Bolus	v	
5-FU	2400 mg/m ²	44 h		→

Wiederholung: d15

Folfiri		Infusions-dauer	d1	d8
Irinotecan	180 mg/m ²	1,5 h		
Leukovorin	400 mg/m ²	2 h		
5-FU	400 mg/m ²	Bolus	v	
5-FU	2400 mg/m ²	46 h		→

Wiederholung: d15

orale Applikation (Capecitabine):

CapOx=Xelox		Infusions- dauer	d1	d8	d15
Oxaliplatin	130 mg/m ²	2 h			
Capecitabine	1000 mg/m ²	(2x/d p.o.)			

Wiederholung: d22

XELIRI		Infusions- dauer	d1	d8	d15
Irinotecan	250 mg/m ²	2 h			
Capecitabine	1000 mg/m ²	(2x/d p.o.)			

Wiederholung: d22

Analyse von DPYD-Polymorphismen zur Abklärung 5-FU-bedingter Nebenwirkungen

