

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Sven Mahner

Untersuchung zu Expression und
Verteilung der
Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
mittels LightCycler®-PCR, ELISA
und Aktivitätstest im Blut
von gesunden Probanden
– ein Vergleich

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Silvia Riemer
aus
München
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Nadia Harbeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Vogesser

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2021

Widmung

für Mama

Danksagung

Prof. Dr. med. Nadia Harbeck
Dr. Micheal Knoll (Roche)
Dipl. Ing. Bastian Dehm (Roche)
Prof. Hubertus Stockinger (ehem. Roche)
Karin Listringhaus (Roche)
Dr. Jutta Mayr (Roche)
Dr. Verena Lutz (Roche)
Dr. Eva Gross (Rdl)
Dr. Tobias Fleige (Labor Becker)
Dr. Alain Hamid (Uni Augsburg)
Dr. Wolfgang Burkart (Uni Augsburg)
Jonathan Beck

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1 MAMMAKARZINOM	1
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>adjuvante Chemotherapie</i>	2
1.2. 5-FLUOROURACIL, CAPECITABIN UND DAS INITIAL ABBAUENDE ENZYM DPD: WIRKUNGSMECHANISMUS	4
1.2.1 <i>5-Fu und das Prodrug Xeloda®</i>	5
1.2.2 <i>Wirkungsmechanismus von 5-FU</i>	7
1.2.3 <i>Metabolismus von 5-FU durch DPD</i>	8
1.2.4 <i>Messung des DPD-Gehaltes: Aktivität und Mutationen</i>	9
1.3. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN DOKTORARBEIT	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. CHARAKTERISIERUNG DES PROBANDENGUTES	13
2.2. GERÄTE UND CHEMIKALIEN	14
2.3. ZELLPRÄPARATION AUS VOLLBLUT	16
2.3.1. <i>Vorversuch: Vergleich von 3 Methoden der Zellisolation</i>	16
2.3.2. <i>Bestimmung der isolierten Zellen</i>	17
2.4. DPD-MESSUNG MITTELS QUANTITATIVER REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION MIT DEM LIGHT-CYCLER®.....	20
2.4.1. <i>RNA-Präparation</i>	21
2.4.2. <i>cDNA-Synthese mit reverser Transkription der RNA (AMV)</i>	25
2.4.3. <i>Quantitative Real-Time PCR mit dem LightCycler®</i>	26
2.4.4. <i>Validierung der RT-PCR-Daten</i>	30
2.5. ELISA: DPD-MESSUNG AUF PROTEINEBENE.....	35
2.5.1. <i>Allgemeine Proteinbestimmung des Zelllysates nach BRADFORD</i>	35
2.5.2. <i>Bestimmung der DPD-Konzentration mit dem ELISA-Kit</i>	35
2.6. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON DPD (PROF. R. B. DIASIO/USA).....	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. PRÄPARATIONSVARIANTEN	38
3.1.1 <i>Auswertung der Zellisolutionsvarianten (Vorversuch)</i>	38
3.2. AUSWERTUNG DER PCR-DATEN.....	40
3.2.1. <i>Auswertung: Total-RNA versus mRNA</i>	42
3.2.2. <i>Auswertung: Hexamer vs. spezifisches Priming</i>	44
3.2.3. <i>PCR-Validierung: Variationskoeffizient</i>	45
3.3. AUSWERTUNG ELISA-DATEN	46
3.4. AUSWERTUNG DER AKTIVITÄTSTEST-DATEN	47
3.5. KORRELATIONSVERSUCH DER 3 MESSMETHODEN	48
4. WISSENSCHAFTLICHE DISKUSSION	50
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATUR	61
7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	70
8. ANHANG:	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 5-Fluorouracil.....	4
Abbildung 2: Xeloda®	5
Abbildung 3: Umwandlung von Xeloda® zu 5-FU.....	6
Abbildung 4: Wirkungsmechanismus von Xeloda® / 5-FU	7
Abbildung 5: Abbau von 5-Fluoropyrimidin	8
Abbildung 6: Proteinstruktur von DPD.....	8
Abbildung 8: Charakteristika des Probandengutes	14
Abbildung 9: Geräte und Chemikalien (Fa Roche)	16
Abbildung 10: Interphase mit WBC.....	18
Abbildung 11: Consort-Diagram Anzahl der eingesetzten Proben	19
Abbildung 13: Protokoll für MagNaPure RNA-Präparation.....	24
Abbildung 14: RT-PCR-Mastermix (Dr. Michael Knoll, FA Roche)	25
Abbildung 15: LightCycler® von Roche.....	27
Abbildung 16: Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Mix für PCR-Ansatz).....	27
Abbildung 17: Ablauf der PCR im LightCycler®	29
Abbildung 18: Prinzip der LightCycler® RT-PCR Methode.....	29
Abbildung 19: Kurvenverlauf RT-PCR im LightCycler®	30
Abbildung 20: Protokoll mRNA-Präparation für Variationskoeffizient	32
Abbildung 21: cDNA-Synthese für Variationskoeffizient	33
Abbildung 22: Ansatz für den LightCycler® am Beispiel der Probe Nr. 153 für Variationskoeffizient.....	34
Abbildung 23 a,b,c: Zellausbeute (WBC) der 3 verschiedenen Aufreinigungen	39
Abbildung 24 a,b: Aufteilung der WBC in Lymphe-, Mono-, Granulozyten	40
Abbildung 25: Amplifikation und Nachweis von DPD mRNA und G6PDH mRNA mit dem LightCycler® DPD Quantifizierungskit	41
Abbildung 26: Kurven vom LightCycler®lauf 79-104 mit CP der Kalibratoren von G6PDH bei 23.7 und DPD bei 29.5 sowie den dazu gemessenen Proben (79,95,96,100,101,102,104).....	41
Abbildung 27: Histogramm über die Verteilung der DPD mRNA in PBMNC's (n=230) / Poster ..	42
Abbildung 28: Vergleich PCR-Ratios DPD aus Vollblut: Gesamt-RNA vs. mRNA.....	43
Abbildung 29: Vergleich PCR Ratios DPD aus PBMNC: Gesamt-RNA vs. mRNA.....	43
Abbildung 30 a,b: Vergleich PBMNC's und Vollblut PCR-Ratios-DPD: spez. Primer vs. Hexamer Primer	45
Abbildung 31: Variationskoeffizient RT-PCR	45
Abbildung 32: Histogramm über die Verteilung des DPD-Proteinexpressionsniveau in PBMNC's	46
Abbildung 33: Verteilung/ Histogramm Aktivitätstest DPD (n=167) in nmol/min/mg Protein (x- Achse)	47
Abbildung 34: PCR CP-Ratio von DPD/G6PDH vs. ELISA DPD ng/mg Protein.....	48
Abbildung 35: DPD-Aktivität nmol/min/mg vs. ELISA DPD ng/mg Protein	49
Abbildung 36: DPD-Aktivität in nmol/min/mg Protein vs. PCR CP-Ratio DPD/G6PD	49
Abbildung 37: Einsatz von Capecitabinen beim Mammakarzinom.....	51
Abbildung 38: Lazar et al. (2008) DPD-Polymorphismen, die im Rahmen schwerer 5-FU- Toxizität berichtet wurden.....	55
Abbildung 39: Del Re 2010 - DPD Polymorphismen, die mit Fluoropyrimidin-Toxizität assoziiert sind.....	55
Abbildung 40: Algorithmus zur Testung der DPD-Defizienz vor geplanter Fluoropyrimidintherapie.....	59
Abbildung 41: Schmelzkurvenanalyse Mutation Exon 14-Skipping	60

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit 1,67 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr (2012) weltweit der häufigste bösartige Tumor der Frau. Über eine halbe Million Frauen versterben jährlich an dieser Erkrankung ((1) Ervik *et al.* 2016). In Deutschland erkranken jährlich 71 640 Frauen an einem Mammakarzinom ((2) 2013 lt. Robert-Koch-Institut), was 31,2% aller weiblichen Krebserkrankungen entspricht. Brustkrebs ist zudem die häufigste Krebstodesursache bei deutschen Frauen (vor Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom und Ovarialkarzinom). Im Jahr 2013 starben insgesamt 17 853 Frauen an einem Mammakarzinom. Das entspricht 17,5% der tumorbedingten Mortalität ((4) ZfKD 2017, (3) Tumormanual Mammakarzinom 2017).

Risikofaktoren an einem Mammakarzinom zu erkranken sind:

- Frauen mit familiärer Belastung
- Frauen mit bereits aufgetretenen Brusterkrankungen und Präkanzerosen
- Frauen mit höherem Lebensalter aufgrund der Altersverteilung des Mammakarzinoms (Erkrankungsgipfel >50. Lebensjahr) bei steigend hoher Lebenserwartung
- Späte Schwangerschaft bzw. Nulliparität
- Reproduktivitäts- und Zykluscharakteristika
- Menopausenstatus
- Konstitutionelle Faktoren (diabetogene Risiken: Ernährungszustand, hoher Body-Mass-Index, wenig körperliche Aktivität)
- Kanzerogene und Ko-Kanzerogene
- Hohe Brustdichte und Veränderungen des Dichtegrades in der Mammographie ((5) Lokate *et al.* 2013)

Die Größe des Tumors sowie vor allem die Ausprägung der axillären und hämatologischen Streuung der Tumorzellen korrelieren negativ mit den Überlebensraten der Patientinnen ((3) Tumormanual Mammakarzinom 2017). Patientinnen mit bereits vorhandenen Metastasen in den axillären Lymphknoten haben ein hohes Risiko auch Fernmetastasen zu entwickeln ((13) Colloquium Senologie 2018/2019).

Neben der histologischen Typisierung in eine der 37 verschiedenen histologischen Formen invasiver Mammakarzinome ((12) Lakhani *et al.* 2012) bilden eine zweite Säule der Klassifikation die sogenannten intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms, die durch RNA-Expressionsprofile definiert sind. Dabei wurden von Perou *et al.* 2000 (10) erstmals die folgenden Subtypen klassifiziert:

- Luminal-A-Karzinome, die sich durch einen positiven ER- und PR-Status und eine niedrige Proliferationsrate auszeichnen
- Luminal-B-Karzinome, ebenfalls hormonrezeptorpositiv mit geringerer Hormonrezeptorexpression und hoher Proliferationsrate, häufig mit ungünstigem Grading
- Basal-like Karzinome mit negativem ER- und PR-Status und negativem HER2-Status (triple-negativ)
- HER2-positive Karzinome

Diese Mammakarzinom-Subtypen bilden eine der wichtigsten Grundlagen sowohl für die Einschätzung der individuellen Prognose, als auch für die Auswahl der optimalen Systemtherapie, sowie für die Entscheidung für oder gegen eine (neo-)adjuvante Chemotherapie.

1.1.2 adjuvante Chemotherapie

Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie sollte in Kenntnis der möglichen Nebenwirkungen und abhängig vom individuellen Risiko der Patientin gestellt werden ((3) Tumormanual 2017). In der Regel ist eine adjuvante Chemotherapie

(+/- Antikörpertherapie) in folgenden Situationen indiziert:

- triple-negativer Tumor (\geq pT1b, pN0)
- HER2-positiver Tumor (\geq pT1b, pN0)
- Luminal-B-Tumor (\geq pT1c) mit zusätzlichen Risikofaktoren

- nodalpositiver Tumor, insbesondere bei >3 befallenen Lymphknoten
 - aggressive Tumorbiologie z.B.:
 - Grading G3
 - hohes Ki67
 - niedrige Hormonrezeptorexpression
 - hohes uPA/PAI-1
 - Genexpressionsanalyse mit hohem Rezidivrisiko
- junge Patientin (<35 Jahre) + aggressive Tumorbiologie

Genexpressionsprofile messen vor allem östrogenrezeptorregulierende und proliferations-assoziierte Gene. Sie haben deshalb die stärkste prognostische Aussagekraft bei Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen.

Bei günstigen Kriterien, d.h. nodal negativer Tumor, tubuläre bzw. muzinöse Histologie, Luminal-A-Subtyp, niedriger uPA/PAI-1 bzw. niedriges Risiko in einer der Genexpressionsanalysen (Onkotype DX – Recurrence Score, Prosigna – PAM50, MammaPrint, EndoPredict) kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden ((3) Tumormanual Mammakarzinom 2017).

Bei einer notwendigen Chemotherapie werden die verwendeten Substanzen in verschiedenen Regimen verabreicht. Die Regime 4x AC und 6x CMF sind gleich effektiv. Ebenfalls zeigte sich, dass Taxan- und Anthrazyklin-haltige Schemata den rein Anthrazyklin-haltigen Regimen signifikant überlegen sind (EBCTCG-Metaanalyse).

So gelten diese beiden Substanzen als die wirksamsten und werden damit in der adjuvanten Chemotherapie beim primären Mammakarzinom als Standard verwendet, unabhängig von Nodal- oder Hormonrezeptorstatus. ((13) Colloquium Senologie 2018/2019).

In der BCIRG-001-Studie (n=1491, nodalpositive Pat.), die das Therapieregime TAC (Docetaxel, Doxorubizin, Cyclophosphamid) mit FAC (5-FU, Doxorubizin, Cyclophosphamid) vergleicht, profitieren die Luminal-B-Tumoren signifikant von der Anthrazyklin- und Taxan-haltigen Kombinationstherapie ((14) Hugh *et al.* 2009).

Die langjährig eingesetzte Polychemotherapie mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) wird derzeit nur noch bei älteren Patientinnen (>65 Jahre) als Standardtherapie (CMF weekly oder Capecitabine mono) nach Abwägung von Nutzen, Nebenwirkungen und Alternativen empfohlen ((15) Muss H.B. *et al.* 2009). Aktuell war 5-FU fast komplett aus der adjuvanten Therapie bei Mammakarzinom verschwunden (auch FEC wird kaum mehr angewandt). Laut Del Mastro *et al.* (Lancet 2015) (7) verbessert 5-FU **nicht** die Wirksamkeit eines anthracyclin- und cyclophosphamidhaltigen Regimes beim frühen Mammakarzinom.

1.2. 5-Fluorouracil, Capecitabin und das initial abbauende Enzym DPD: Wirkungsmechanismus

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Fluoropyrimidin, ein Analogon der Nukleinbase Uracil und ein Antimetabolit. Es wird seit mehr als 60 Jahren (erste Therapieanwendung 1962) als Therapeutikum / Zytostatikum bei zahlreichen malignen Tumoren, wie kolorektale Karzinome, Plattenepithelkarzinome, Kopf-Hals-Tumore und unter anderen (vor 20 Jahren häufiger) auch beim Mammakarzinom, eingesetzt.

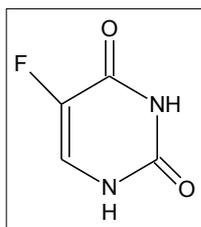


Abbildung 1: 5-Fluorouracil

Die Basis der Chemotherapie bei Darmkrebs besteht aktuell immer noch aus 5-Fluorouracil in Kombination mit Folinsäure (5-FU/FA Schema) oder einer Kombination mit Oxaliplatin (FOLFOX-Schema).

1.2.1 5-Fu und das Prodrug Xeloda®

5-Fluorouracil blieb als Monotherapie trotz seines niedrigen Ansprechens (um 10-15%) weiterhin als Standardtherapie bei kolorektalen Karzinomen bestehen ((16) Moertel *et al.* 1994), allerdings nun in Kombination mit Oxaliplatin und Irinotecan. Als Infusion hat 5-FU nur eine kurze Halbwertszeit (8-20min; (19) Diasio RB, *et al.* 1989 / 10-30min; (18) Zeller, *et al.* 1996) was mit Überdosierung bzw. Dauerinfusionen ausgeglichen wurde und zu hohen Konzentrationsspitzen im Patientenplasma führte. Zudem birgt die Verwendung von Fluoropyrimidinen ein unglückliches Risiko für hohe toxische Nebenwirkungen von bis zu 30%, wie Neuropenie, Diarrhoe, Stomatitis, schmerzhaftes Hand-Fuß-Syndrom, Mukositis u.a., welche unter Umständen zum Tod führen können ((17) Hoff, *et al.* 1999; (20) Lamont und Schilsky, 1999; (21) Roche Pharma, 1998). Von einer oralen Gabe von 5-FU wurde lange abgesehen, da Studien gezeigt hatten, dass die 5-FU-Level im Plasma bei oraler Gabe stark von Patient zu Patient, aber auch bei ein und demselben Patienten variierten ((20) Lamont, *et al.* 1999). Verantwortlich hierfür ist in erster Linie die unterschiedliche Eliminierung von 5-FU während der ersten Leberpassage und damit auch die Eliminierung des Medikamentes durch das initiale und geschwindigkeitsbestimmende Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase.

Um vor allem die Wirksamkeit aber auch die Verträglichkeit der Fluoropyrimidine zu verbessern, wurde 5-FU von Roche biochemisch umgewandelt in ein orales Prodrug: genannt **Capecitabin** (N⁴-Pentoxycarbonyl-5-deoxy-5-fluorocytidin: Xeloda® von Roche)

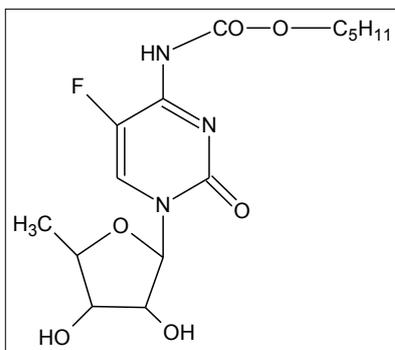


Abbildung 2: Xeloda®

Dieses „Prodrug“ genannt **Xeloda®** wird in der Leber metabolisiert und bevorzugt in Tumorzellen zum eigentlichen Wirkstoff 5-FU umgewandelt. Das oral verabreichte **Xeloda®** wird über die Darmmukosa aufgenommen und zum größten Teil zur Leber transportiert ((17) Hoff *et al.* 1999). Dort wird es durch Carboxylesterasen in die ebenfalls noch unwirksame Vorstufe 5'-Deoxy-5-Fluorocytidin (5'-dFCR) umgewandelt (Abb.3). Die darauffolgende Desaminierung erfolgt durch das Enzym Cytidineaminase, welches hauptsächlich in der Leber, im Blutplasma und im Tumorgewebe aktiv ist ((17) Hoff *et al.* 1999). Das zytotoxisch aktive 5-FU wird durch die Thymidin-Phosphorylase (TP) freigesetzt. Im Vergleich zu Normalgewebe zeigt Tumorgewebe eine bis zu 10fache höhere TP-Aktivität wodurch gezielt im Tumor eine hohe 5-FU-Konzentration erreicht werden kann. ((20) Lamont und Schilsky *et al.* 1999). Dies führt zu einer verbesserten Verträglichkeit und macht die Therapie etwas effizienter als bei der i.v.-Gabe.

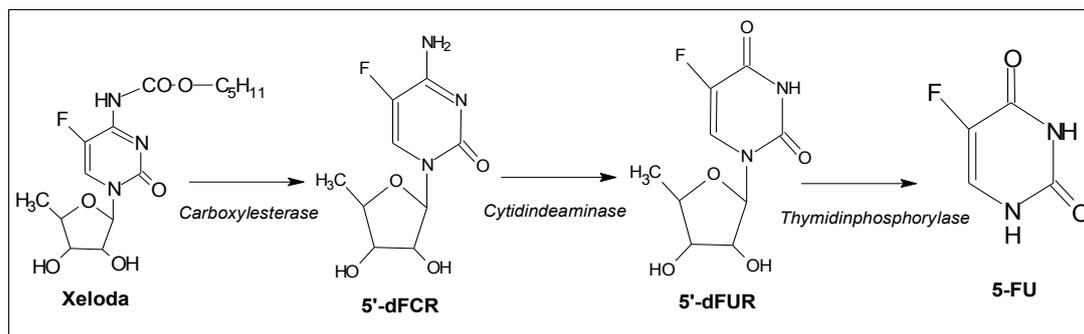


Abbildung 3: Umwandlung von Xeloda® zu 5-FU

Xeloda® (Capecitabine) ist heute in der Metastasierung beim Mammakarzinom eines der am häufigsten verwendeten Medikamente. Es ist unter anderem auch zugelassen in Kombination mit Avastin, sowie als **Xeloda®** mono und wird hauptsächlich in der 2. und 3. Linientherapie (mit Trastuzumab oder Lapatinib) bei HER2-positiven Tumoren verstärkt eingesetzt. Vor allem jedoch auch in der postneoadjuvanz beim Triple-negativen Mammakarzinom in der non-pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie findet **Xeloda®** heute seinen Einsatz. Damit findet es Verwendung bei mehr als 40% aller triple-negativen frühen Mammakarzinome und ist heutzutage ein wichtiges Drug. (CREATE-X-Study, (45) Masouda *et al.* 2017) Siehe hierzu auch Tabelle/Abb 37: Einsatz von Capecitabinen beim Mammakarzinom

1.2.2. Wirkungsmechanismus von 5-FU

Die Medikamentenklasse der Fluoropyrimidine, hier 5-FU, sind Uracil-Analoga mit einem Fluoratom statt eines Wasserstoffatoms an der C5-Position des Pyrimidinringes. So blockiert das, durch eine Enzymkaskade in das Desoxynucleotid-Derivat 5-Fluorouridin-Triphosphat (5-FUTP) umgewandelte, 5-FU die Translation der mRNA direkt am Ribosom ((22) Diasio *et al.* 1999). Nun wird 5-FU zu 5-Fluorodesoxyuridin-Triphosphat (5-FdUTP) katabolisiert, welches in die DNA eingebaut wird und hier durch Instabilität zu Strangbrüchen führen kann.

Eine weitere wesentliche zytotoxische Wirkung von 5-FU beruht auf der reversiblen Hemmung der Thymidylat-Synthase (TS) durch einen 5-FU-TS-Komplex. Die Thymidylat-Synthase stellt als einziges Enzym essentielle Thymidin-Triphosphate (dTTP) für die DNA bereit. Somit ist die DNA-Synthese und damit letztlich das Zellwachstum gehemmt ((17) Hoff *et al.* 1999; (20) Lamont und Schilsky, 1999; (18) Zeller *et al.* 1996).

Wie oben bereits erwähnt, hängt die Verfügbarkeit und Wirkung von 5-FU jedoch stark von seinem Metabolismus im Körper ab. Trotz der nun verbesserten oralen Applikation wird immer noch eine starke Schwankung bei Verträglichkeit und Wirksamkeit des Medikamentes beobachtet. Hierbei spielt das 5-FU-abbauende Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase eine entscheidende Rolle ((22) Diasio *et al.* 1999; (23) Gonzalez und Fernandez-Salguero *et al.* 1995; (24) Johnson *et al.* 1997; (25) Milano *et al.* 1999).

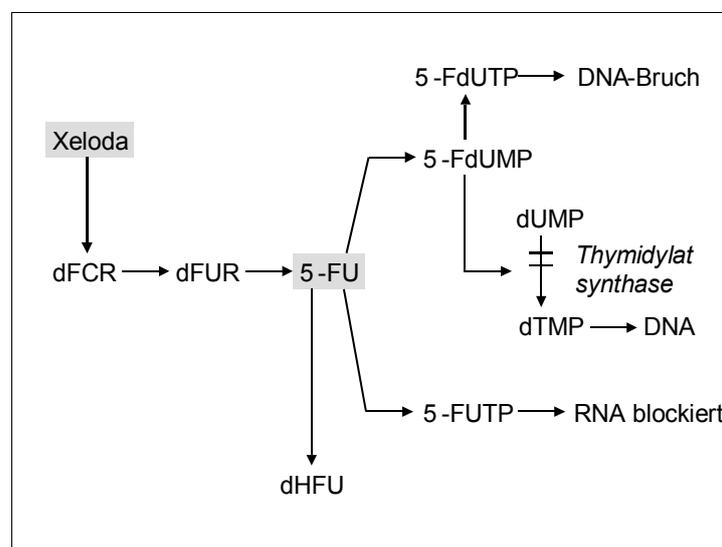


Abbildung 4: Wirkungsmechanismus von Xeloda® / 5-FU

Letztendlich sind es drei Enzyme, die eine zentrale Rolle beim Wirkungsmechanismus von 5-FU spielen: Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD), Thymidylat-Synthase (TS) und Thymidin-Phosphorylase (TP)

Die Aktivität dieser Enzyme ist somit von Bedeutung für die Therapieeffizienz von 5-FU sowie auch zur Vorhersage der möglichen Ausprägung von toxischen Reaktionen unter 5-FU-Therapie.

1.2.3. Metabolismus von 5-FU durch DPD

Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) ist das initiale Enzym im dreistufigen 5-FU-Katabolismus ((17) Hoff *et al.* 1999). Seine Aktivität bestimmt die pharmakologisch wirksame Menge an 5-FU im Blut und im Tumorgewebe. Durch DPD werden 80-90% des verabreichten Chemotherapeutikums 5-FU abgebaut und somit unwirksam als alpha-Fluoro-beta-alanin (FBAL) mit dem Urin ausgeschieden. Dies geschieht durch Übertragung eines Wasserstoffatoms auf Pyrimidine wie Uracil, Thymin, und auch 5-FU, welche dadurch zu Dihydropyrimidinen reduziert werden.

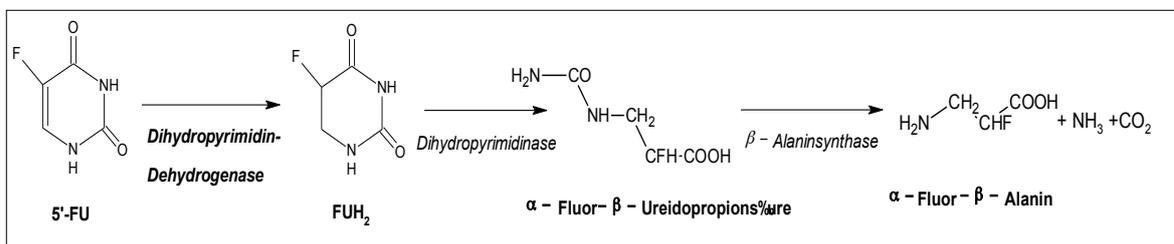


Abbildung 5: Abbau von 5-Fluoropyrimidin

Die Proteinstruktur der DPD ist ein Homodimer und besteht aus zwei identischen Untereinheiten zu je 110 kDa ((28) Lu *et al.* 1992). Das DPD-Gen ist auf dem Chromosom 1p22 lokalisiert ((27) Wei *et al.* 1998). Es besteht aus 23 Exons (3078 Basenpaaren) siehe Abb. 6 und 7.

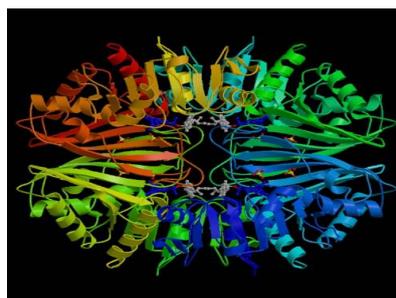


Abbildung 6: Proteinstruktur von DPD

Neben der Substratbindungsstelle besitzt das Enzym weitere Bindungsstellen für Cofaktoren wie NADPH/NADP, FAD, FMN.

DPD ist also nicht nur das initiale sondern auch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim Abbau von Thymin und Uracil und damit auch von 5-FU mit NADPH₂ als Cofaktor und Wasserstoffdonor.

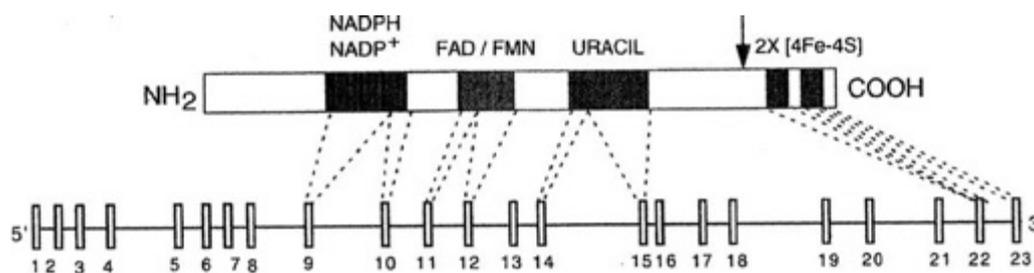


Abbildung 7: Genkarte des DPYD Gens (Wei et.al. 1998) (27)

1.2.4. Messung des DPD-Gehaltes: Aktivität und Mutationen

In der Weltbevölkerung weist die DPD-Aktivität sehr große Schwankungen auf. Für diese Schwankungsbreite sind in vielen Fällen Mutationen im DPYD-Gen verantwortlich. Studien zeigen, dass etwa 3-5% der Weltbevölkerung heterozygot Mutationen im DPYD-Gen aufweisen ((54) Lu *et al.* 1993). Bisher wurden mehr als 100 Polymorphismen im DPYD-Gen beschrieben wobei mehr als 9 davon mit verminderter oder auch ganz fehlender Enzymaktivität einhergehen ((26) Coenen MJH *et al.* 2018).

Lange galt die Aktivitätsbestimmung als Goldstandard der DPD-Analyse. Die Aktivitätsbestimmung ist jedoch sehr aufwendig, teuer und erfordert radiochemische Methoden, was bei der geringen spezifischen Aktivität der DPD sehr kritisch zu betrachten ist ((42) Jacobs BAW *et al.* 2016).

Seit ca. 2001 konzentrierte sich der Schwerpunkt der Untersuchungen zunehmend auf die Mutationsanalyse des DPYD-Gens. Das Ziel war dabei, die Träger einer eventuell klinisch relevanten Mutation vor einer 5-FU-Therapie zu detektieren. Als Beispiel: führt eine Punktmutation im Intron 14 der Splice-Donor-Region: IVS14+1 g>a (DPYD*2A) zum Verlust des Exons 14 und bewirkt den kompletten Funktionsverlust des Enzyms DPD ((41) Wei *et al.* 1996, (37)

Raida *et al.* 2001).

Interindividuell ließen sich bis jetzt reichlich Polymorphismen in der Enzymstruktur nachweisen, mit teils starken Schwankungen in der Enzymaktivität, welche aber oft auch **keine** pathologische Konsequenz mit sich brachten. Dies erschwert die Anforderungen an einen effektiven und aussagekräftigen prätherapeutischen Screeningtest noch zusätzlich.

Zudem ist in der Literatur ein zirkadianer Rhythmus der DPD beschrieben, der aber wohl bisher keine Störung in der Abbaurate der zu metabolisierenden Substanzen bewirkt ((42) Jacobs BAW *et al.* 2016), wohl aber bei Aktivitätsmessungen zu berücksichtigen ist.

Es wird nach wie vor von Patienten berichtet, die durch eine Therapie mit 5-FU an schwersten Toxizitäten Grad 3-4 (WHO) leiden und deren Mortalität unter Therapie infolge dessen sehr hoch ist. Frühe schwere Nebenwirkungen treten bei ca. 19,3% sowie schwere Nebenwirkungen innerhalb der ersten 6 Monate bei ca. 30% der Patienten auf ((36) Barin-Le Guellec, *et al.* 2019; (38) Wigle, *et al.* 2019). Hauptsächlich werden, wie bereits erwähnt, neurologische und hämatologische Symptome berichtet sowie Alopezie, schmerzhaftes Hand-Fuß-Syndrom, und zusätzlich noch Stomatitis, Mukositis und Nausea ((35) Johnson *et al.* 1999, (37) Raida *et al.* 2001, (40) van Kuilenburg *et al.* 2000).

Der Nutzen einer Therapie mit 5-FU ist für die davon betroffenen Patienten dann leider sehr gering.

Damit stellt sich hier nach wie vor die große Aufgabe: vor einer Therapie mit 5-FU dieses, von schweren Nebenwirkungen betroffene, Patientenkollektiv zu identifizieren, eine 5-FU-Toxizität vor geplanter Therapie zu detektieren, um eine individuell effektive gegebenenfalls Anfangs dosisreduzierte Therapie einzuleiten.

1.3. Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit

In der Literatur ist beschrieben, dass die DPD-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit der DPD-Aktivität in Leberparenchymzellen und mit einer 5-FU-Clearance korreliert ((29) Chazal *et al.* 1996).

In der vorliegenden Arbeit sollen 3 Methoden miteinander verglichen werden, die DPD-Konzentration in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) zu bestimmen.

Die experimentelle Arbeit fand 1999/2000 im Labor der Firma Roche Diagnostics in Penzberg statt. Damals wurden Blutproben von 245 gesunden Probanden (kaukasisch, Mitarbeiter der Fa. Roche) gewonnen, jeweils morgens zwischen 8:00 und 10:00 Uhr, um Störungen durch den zirkadianen Einfluss zu minimieren.

Aus diesen Proben wurden mit einer standardisierten Methode (Ficollüberschichtung) – die in einem Vorversuch aus drei verschiedenen Extrahierungsmethoden ausgewählt worden war - die mononukleären Zellen (PBMNC) extrahiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Nach Suspension wurden von jedem Probanden 3 Aliquots der extrahierten PBMNC's als Zellpellets in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Im Folgenden wurde aus den Aliquots jeweils die Konzentration des Enzyms DPD analysiert:

- auf mRNA-Ebene mit quantitativer „real-time“-PCR (Labor Roche Diagnostics, Penzberg)
- auf Proteinbasis mit ELISA (Labor Roche Diagnostics, Penzberg)
- mittels Aktivitätstest (extern: Labor B. Diasio, USA)

Die analysierten, erhaltenen Daten wurden verglichen und es wurde versucht eine Korrelation der Ergebnisse aus diesen drei Messungen zu erstellen.

Ziel der Arbeit war es damals, einen klinisch praktikablen und aussagekräftigen Test zu entwickeln, der die DPD-Konzentration im peripheren Blut bestimmt. Damit könnte dann evtl. auch die Verifizierung von Mutationen auf dem DPYD-Gen erleichtert werden und Patienten/-innen vor Durchführung einer Chemothe-

rapie mit 5-FU, im Hinblick auf die Inaktivität des initial metabolisierenden Enzyms DPD, nach einschränkenden Mutationen gescreent werden.

In der hier vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse nun rückblickend nochmals kritisch analysiert und im Vergleich zu den aktuell existierenden Testverfahren einer DPD-Bestimmung vor geplanter 5-FU-Therapie diskutiert.

2. Material und Methoden

Die Arbeit fand im Rahmen eines Kooperationsprojektes der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik TUM in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Manfred Schmidt und Roche Diagnostics in Penzberg statt. Medizinische Betreuerin dieser Arbeit ist Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck.

Für die DPD-Analyse auf Genomebene wurde eine damals relativ neue RT-PCR-Technologie verwendet, welche die „Echtzeit-Quantifizierung“ von mRNA aus PBMNC's ermöglicht.

Zur Analyse auf Proteinebene wurde ein standardisiertes Verfahren mittels ELISA mit den ELISA-Roche-Kits (DPD ELISA 2 207 184 und TP ELISA 2 158 744) durchgeführt.

Die Aktivitätsanalyse aus den PBMNC-Aliquots wurde im Labor von Prof. Robert Diasio, University of Alabama at Birmingham (USA) durchgeführt. Die erlangten Daten wurden zur Auswertung an Roche Diagnostics in Penzberg zurückgeschickt.

Ein Einverständnis der Firma Roche Diagnostics, Penzberg zur Publikation der Daten im Rahmen dieser Doktorarbeit liegt vor. (Anhang: Freigabe)

2.1. Charakterisierung des Probandengutes

Bei den untersuchten Probanden handelt es sich um einen Durchschnitt durch die gesunde kaukasische Normalbevölkerung. Hier dargestellt von Mitarbeitern der Firma Roche in Penzberg, im Alter von 20-65 Jahren, männlich und weiblich in etwa gleichem Verhältnis.

Um den Einfluss des zirkadianen Rhythmus der DPD-Aktivität auf die Messungen zu minimieren wurde allen Probanden morgens zwischen 8:00 und 10:00 Blut abgenommen.

Charakteristika der Probanden	Zahl (Gesamt: n=245)	Prozent (Gesamt: 100%)
Alter (Jahren)		
Maximum	58	
Minimum	18	
Mittelwert	36	
Geschlecht		
Männlich	117	47,8
Weiblich	128	52,2
Gesund	208	85
leichter grippaler Infekt	37	15

Abbildung 8: Charakteristika des Probandengutes

2.2. Geräte und Chemikalien

Blutauarbeitung	
EDTA-Vacutainer Cell	Becton&Dickinson
Falcon-Röhrchen 15ml und 50ml	Greiner
PBS-Puffer / Phosphat Buffered Saline (pH 7,4)	Roche
Red Blood Cell Lysis Buffer	Boehringer Mannheim (1814389)
Ficoll-Histopaque-1077	Sigma Diagnostics
Zentrifuge	Heraeus
Pipette (1000µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (1000µl)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (Cryotubes) 5ml mit verschieden farbigen Deckeln weiß, rot, gelb, grün	Sarstedt
Zellzählung mit CASY 1 / FACS	Roche
Neubauer-Zählkammer	Roche
Gefrierschrank -80°C	Roche
Flüssiger Stickstoff	Roche

DPD-Bestimmung mit RT-PCR	
HighPure RNA Isolation Kit	Roche (1828665)
Magna-Pure LC mRNA Isolation Kit I	Roche (3004015)
LC DPD mRNA Quantification Kit	Roche (3136957)
LC TP mRNA Quantification Kit	Roche (3136965)
RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bonemarrow	Roche (1934317)
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche (1483188)
Pipetten (50µl,100µl,200µl,1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
MagNA Pure LC (Version 2.1 /"Alf")	Roche Diagnostics (Penzberg)
LightCycler® (Version 1.0)	Roche (2011468)
LightCycler® Kapillare	Roche (1909339)
LightCycler® Software Version 1.0	Roche (3158527)
RelQuant Software Version 1.01	
LightCycler® Carousel Centrifuge	Roche (2189682)
LightCycler® – DNA Master Hybridization Probes	Roche (2015102)
LightCycler® Control Kit DNA	Roche (2015129)
LightCycler® RNA Amplification Kit	
Hybridization Probes	Roche (2015145)
LightCycler® Centrifuge Adapters	Roche (1909312)
LightCycler® Sample Carousel	Roche (1909282)
Transkription:	
Spezifische Primer (DPD, G6PDH)	
Steriles Wasser	
AMV-RT-PCR-Kit	Roche (148188)
AMV-reverse Transkriptase	
Puffer	
Kalibrator RNA (Total-RNA aus Zelllinien, welche DPD exprimieren)	
cDNA-Synthese Stabilisationspuffer	
„fast start“ Taq DNA-Polymerase	

Magnesiumchlorid 25mM	
DPD-Detection Mix	
G6PDH-Detection Mix	
ELISA:	Roche (2207184)
Dihydropyrimidine Dehydrogenase	
ELISA	Roche (2158744)
Thymidine Phosphorylase ELISA	Cat.(500-0006)
BioRad Protein Assay	

Abbildung 9: Geräte und Chemikalien (Firma Roche)

2.3. Zellpräparation aus Vollblut

2.3.1. Vorversuch: Vergleich von 3 Methoden der Zellisolation

Aus drei verschiedenen Präparationsmethoden wurde in einem Vorversuch (mit 24 Probanden) getestet, welche Methode eine geeignete und praktikable Zellpräparation ergibt.

2.3.1.1. CPT-Vakutainer (Becton&Dickinson)

CPT-Vakutainer sind Vakuumröhrchen und dienen der Zellpräparation von mononukleären Zellen aus ca. 8ml Vollblut. Das Blut wurde aus einer peripheren Vene direkt in die Vakuumröhrchen abgenommen und durch mehrmaliges Schwenken mit der darin enthaltenen Natriumcitratlösung vermischt. Nach der Zentrifugation (1500-1800g, 25min, 20°C ohne Bremse) wurde die Interphase, bestehend aus mononukleären Zellen, mit der Pasteurpipette abgenommen und in Falcon-Röhrchen (15ml) überführt.

2.3.1.2. Leucosep-Röhrchen (Greiner) / Ficollüberschichtung

In die Greiner-Röhrchen mit einem eingesetzten Filter wurde zunächst 3ml Ficoll Histopaque (Sigma) gegeben und unter den Filter zentrifugiert (1000g, 30sec, Raumtemperatur, ohne Bremse).

Auf den Filter wurde jeweils 6ml Vollblut, welches vorher mit EDTA versetzt worden war, pipettiert und nochmals zentrifugiert (1000g, 10min, RT, o.B.).

Die Interphase mit den darin enthaltenen WBC's wurde ebenfalls in ein Falcon-

Röhrchen (15ml) überführt.

2.3.1.3. Erythrocytenlyse mit Redbloodcell-Lysepuffer (Roche)

In Falcon-Röhrchen (15ml) wurden je 5ml EDTA-Vollblut mit 10ml RBC-Lysepuffer (Roche Cat.No. 1814389) versetzt und 10min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsrad gemischt. Sodann wurde die Lösung abzentrifugiert (600g, 10min, Raumtemperatur RT) und der Überstand verworfen. Das Sediment, bestehend aus Leukozyten (= weiße Blutkörperchen) wurde in 1ml PBS-Puffer resuspendiert.

Die aus diesen drei Isolierungsmethoden gewonnenen Zellen wurden jeweils in 20ml PBS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (300g, 8min, RT, mit Bremse). Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt, die Überstände jeweils abgesaugt, verworfen und die Zellen schließlich in 20ml PBS-Puffer aufgenommen.

2.3.2. Bestimmung der isolierten Zellen

2.3.2.1. Zellzahl ausgezählt in der Neubauer-Zählkammer

Je ein Aliquot der so entstandenen Zellsuspensionen in 10ml Volumen wurde 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt (10 μ l Zellpool (ZP) +190 μ l PBS), damit der Zelltiter mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt werden konnte. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen zweier Großquadrate der Neubauerkammer berechnet.

Gesamtzellzahl der isolierten WBC's: Für ein Beispiel von 40ml Vollblut in 10ml Zellpool (ZP) nach Greineraufreinigung:

$116 + 129 / 8 \times 10\,000 \times 20 = 6,125 \times 1\,000\,000 / \text{ml} \times 10\text{ml (ZP)} + 40\text{ml (VB)}$
ergibt 1,53 x 1 000 000 Zellen /ml Vollblut

2.3.2.2. Zellzahlbestimmung der Vorversuchsproben mit CASY und FACS

Um die Zellausbeute aller drei verschiedener Zellaufreinigungen zu erfassen, wurde von 5 Probanden im Vorversuch jeweils eine Probe mit dem CASY®1 bei Roche/Penzberg vermessen. Hierbei konnte mit dem FACS auch das Verhältnis von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten erfasst werden.

2.3.2.3. Zellzahlbestimmung in der klinischen Chemie

Um ein differenziertes Bild der isolierten Zellen zu bekommen wurde damals von jedem Zellpool auch ein Blutbild in der klinischen Chemie des Klinikum Rechts der Isar erstellt.

Vorgehen beim Probandenkollektiv n=245:

Das Vollblut (je Proband 40ml) wurde mit 40ml PBS-Puffer (bei Raumtemperatur) 1:1 verdünnt. Das verdünnte Vollblut wurde sodann langsam und vorsichtig in die bereits vorbereiteten, mit 15ml Ficoll (Raumtemperatur) gefüllten und beschrifteten, Falcon-Röhrchen (50ml) überschichtet. Die überschichteten Falcons wurden bei 1000g, 15min ohne Bremse zentrifugiert. So gewannen wir eine Interphase mit „White blood cells“.

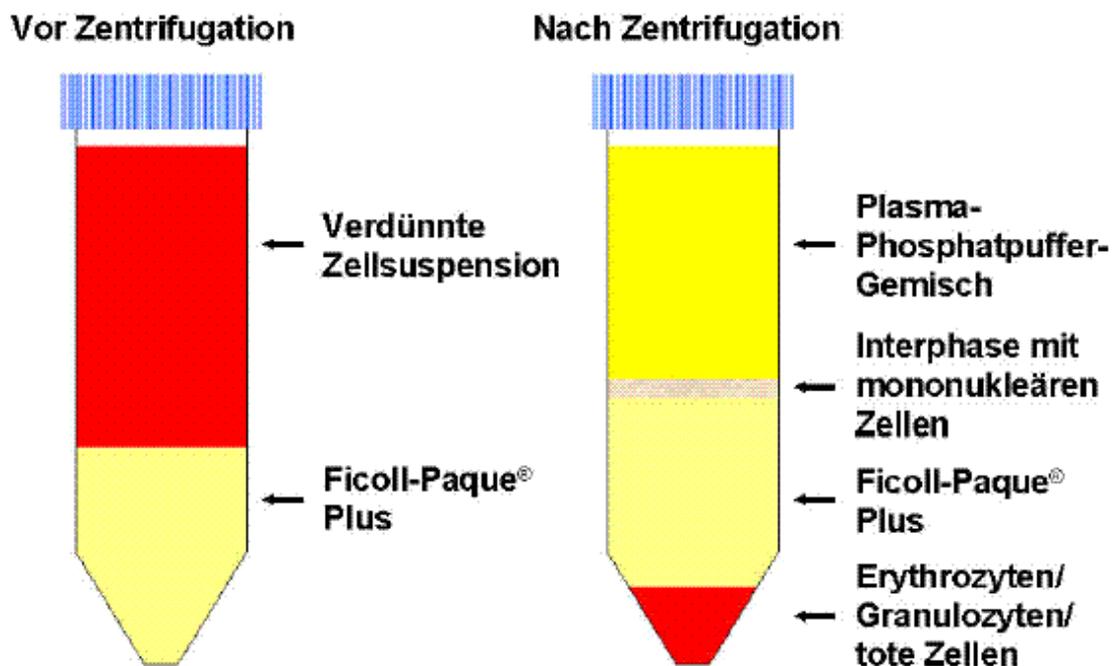


Abbildung 10: Interphase mit WBC

Das Serum – die oberste Phase – wurde mit einer Vakuumpumpe bis knapp über der Interphase abgesaugt, sodass die Zellen der Interphase mit der Eppendorfpipette (1000µl-Aufsatz) vorsichtig in jeweils 15ml Falcon-Röhrchen zum Waschen überführt werden konnten. Die Zellen der Interphase wurden jeweils 2x mit PBS-Puffer gewaschen, d.h. in PBS-Puffer resuspendiert und wieder ab-

zentrifugiert bei diesmal 300g je 10min mit Bremse. Der überstehende PBS-Puffer wurde jeweils mit der Vakuumpumpe bis knapp über dem Zellpellet abgesaugt. Nach dem 2. Waschvorgang wurde das Zellpellet in 10ml PBS-Puffer (Raumtemperatur) resuspendiert, so dass sich ein Zellpool ergab. Aus jedem Zellpool wurde eine Probe in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Der gut gemischte Zellpool von 10ml wurde sodann aliquotiert.

- 1x5ml Aktivitätstest
- 1x3ml ELISA
- 2x1ml RT-PCR

Außerdem wurde das übrige Restvollblut in Falcon-Röhrchen bei -20°C gelagert und einer Mutationsanalyse mittels DHPLC bzgl. des DPD-Genes im Klinikum Rechts der Isar (Arbeitsgruppe Dr. Evi Gross) zugeführt (siehe (74) Dissertation K. Seck 2006).

Die Proben standen - durch natürlichen Ausschuss bedingt - nicht alle für jedes Testverfahren zur Verfügung, was die unterschiedlichen Fallzahlen in der Auswertung erklärt. Hier eine Übersicht der eingesetzten Probenzahlen:

Übersichtstabelle: Eingesetzte Probenanzahl bei den gewählten Analysen

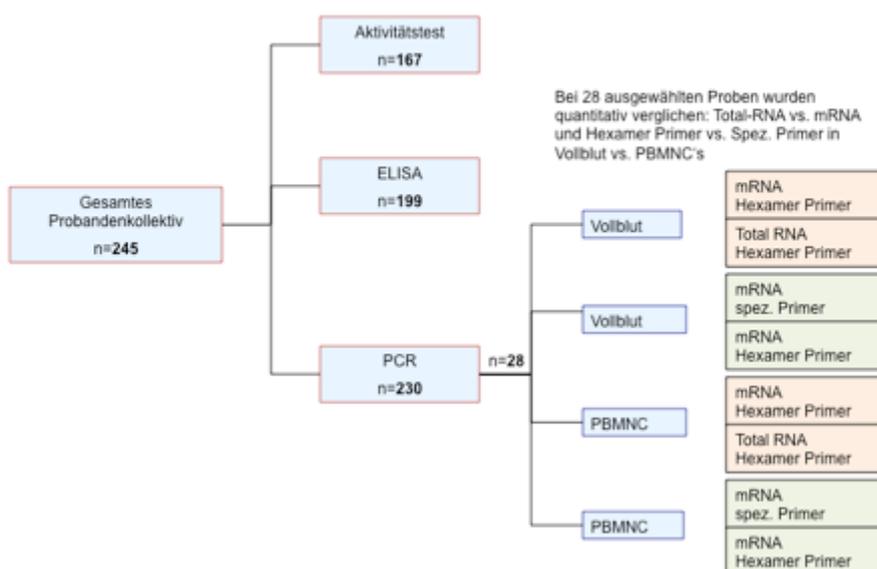


Abbildung 11: Consort-Diagramm Anzahl der eingesetzten Proben

2.4. DPD-Messung mittels quantitativer Real-time Polymerase-Kettenreaktion mit dem Light-Cycler®

Was ist PCR? In der Theorie besteht die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), für die der Erfinder *Karry B. Mullis* 1993 den Nobelpreis erhielt, durch ihre Einfachheit.

Bei der PCR handelt es sich um eine enzymatische Reaktion zur in-vitro Amplifikation von DNA. Das beteiligte Enzym (Taq-DNA-Polymerase) stammt aus einem thermophilen Bakterium, das in heißen Quellen heimisch ist und *Thermus aquaticus* genannt wird. Sie besitzt eine 5'-3'-Polymerase- und eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und hat ihr Temperaturoptimum bei 70-75°C. Durch ihre Hitzestabilität bleibt die Polymerase trotz mehrfacher Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges auch bei 95°C aktiv.

Um vorzeitige unspezifische Amplifikation der DNA vor der PCR zu verhindern, wurde ein Antikörper gegen die Taq-Polymerase verwendet. Der Antikörper blockiert die Polymerase so lange, bis er bei dem initialen Denaturierungsschritt (95°C, 1min) inaktiviert und damit das Enzym aktiviert wird.

Neben der Taq-Polymerase benötigt man nun noch die Bausteine der DNA (Nukleotide) und zwei sogenannte „Primer“. Bei diesen Primern handelt es sich um kleine DNA-Stücke, die aufgrund ihrer Sequenz spezifisch an die DNA-Bereiche binden, die man nachweisen will. Um eine erfolgreiche PCR durchzuführen, benötigt man selbstverständlich einige wenige Kopien der Erbsubstanz, die man nachweisen möchte. (GENE-SCAN GmbH, Freiburg)

2.4.1. RNA-Präparation

2.4.1.1. Gesamt-RNA-Präparation mittels High-Pure RNA Isolation Kit

Zur Gewinnung von cDNA (engl. complementary DNA) als Vorlage für die PCR (engl. polymerase chain reaction) musste zunächst mit dem High-Pure RNA Isolation Kit die RNA aus den Proben extrahiert werden.

Hierbei wurde die Gesamt-RNA extrahiert:

Hierzu verwendetes Protokoll (von Dr. Jutta Mayr, Dr. Michael Knoll, BP-Z7, Roche Diagnostics)

DNase-1-Lyophilisat des „High Pure RNA Isolation Kit“ in 550µl Elutionspuffer lösen, in 50µl-Portionen aliquotieren; bei -20°C lagern.

Wichtig beim Waschen der Filter: der Puffer aus dem Reservoir (hier: 2ml Reaktionsgefäß) darf nach der Zentrifugation nicht in Filter zurückgezogen werden.

-in 50ml Gefäßen je 20ml „RNA/DNA-Stabilisierungsreagenz“ (Roche: 193417) vorlegen

-zu 10ml Vollblut (EDTA, Citrat oder Heparin) 150µl 0,5M EDTA (pH8.3) zugeben. Blut in 50ml-Gefäße mit Stabilisierungsreagenz überführen, 30min auf Rollinkubator bei RT inkubieren, zwischendurch vortexen.

-stabilisiertes Blut in 2ml Reaktionsgefäßen in 1ml-Aliquots bei -21°C einfrieren

(in diesem Zustand ist die Probe mind. ÜN (bis zu einem Tag) bei 4°C und mehrere Wochen (bis zu einem Jahr) bei -20°C haltbar)

→ statt Vollblut verwendete Zellpellets (ca. 1x 100 000 Zellen) + 230µl PBS + 750µl Stabilisierungsreagenz – gut mischen!

-je 750µl Lysat (entspricht 250µl Vollblut) auf Filtertubes aus dem „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche: 1828665) pipettieren.

-Filter in 2ml Reaktionsgefäßen 1min bei 10000rpm in Tischzentrifuge zentrifugieren, Durchlauf verwerfen

-Filter in frisches 2ml Reaktionsgefäß überführen und erneut 1min bei 10000rpm zentrifugieren (wichtig, da der gesamte Lysepuffer entfernt werden muss!)

-zu 50µl DNase-Lösung 450µl DNase-Inkubationspuffer geben (für jede Säule werden 100µl dieser Verdünnung benötigt)
-100µl der DNase-Verdünnung auf Filter pipettieren und 15min bei RT inkubieren
-DNase-Verdau durch Zugabe von 500µl Waschpuffer 1 abstoppen, 1min bei 10000rpm zentrifugieren, Säulendurchlauf verwerfen
-je Filter 500µl Waschpuffer 2 zugeben, 1min bei 10000rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
-erneut 200µl Waschpuffer2 zugeben, 1min bei 10000rpm zentrifugieren (wichtig: es dürfen keine Pufferreste verbleiben), Durchlauf verwerfen
-Elution der RNA in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100µl Elutionspuffer und Zentrifugation für 1min bei 10000rpm.
-Parallel-Ansätze vereinigen
-Messung der RNA-Menge: 1:10-Verdünnung der RNA (möglichst: 50µl RNA-Eluat+450µl Wasser) in Meßküvette geben, durch Auf- und Abpipettieren mischen.
Meßvorgang bei 260nm und 280nm; 1OD=33µg RNA/ml
-RNA in 9,9µl Aliquots bei -20°C einfrieren (10µl des Eluats entsprechen 25µl Blutäquivalent)

Zeitbedarf: ca. 30min für 10 Präparationen
Ausbeute: 1-6µg Gesamt-RNA pro ml Vollblut, höhere Ausbeuten deuten auf DNA-Kontamination hin
Reinheit (280:260nm): 1,9-2,2

Abbildung 12: Protokoll Gesamt-RNA Präparation

2.4.1.2. mRNA-Präparation mit MagNa Pure

Der „MagNa Pure LC mRNA Isolation Kit I“ wurde zur Aufreinigung von mRNA aus Vollblut, WBC's, PBMC's oder Zellkulturen entwickelt. Die aufgereinigte mRNA kann dann nach Transkription in cDNA im LightCycler® zur RT-PCR eingesetzt werden.

MagNa Pure-Protokoll (mRNA 1 bzw. total RNA for Blood)

Cat.Nr.: 3 004 015 bzw. 3 004 007 (MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I bzw. MagNa Pure RNAisolation Kit I)

Vorgehen: Anschalten zuerst Ge-
 rät (Alf)
 dann Moni-
 tor
 dann Rechner

Magna Pure Version 2.1 anklicken

Start Programm

Handschuhe!

Kontrolle Flüssigabfall (ob der an seinem Platz und Füllzustand)

Abfallsack

Gerät reinigen: Bügel hoch

Pipettenhalterungen (gelb und blau) rausnehmen
und Pipetten entfernen

Halterung für Lösungs-Rages rausnehmen

alles reinigen mit Papiertuch und DNA-Zap 1 zuerst
und dann mit DNA-Zap 2 nachwischen

alles wieder einsetzen und schließen

Sample Ordering

Sample Protocoll

mRNA oder total RNA for
blood

Sample Volumen

100 µl

Elutions Volumen

100 µl

32 Proben mit dem Lysis buffer (300µl) in die Probencardridge einpipettieren!

Start Batch

nun erscheint auf dem Bildschirm, was alles in das Gerät eingesetzt werden muss.

Pipettenspitzen, Behälter, Probencartridges,...
zuerst mit allen Plastikeinsätzen bestücken

dann Proben vorbereiten (mit Lysis buffer mischen)

und Lösungen in die Behälter pipettieren
(zuletzt : DNase Solution und MBP)
zuletzt MBP (Magnetic Bead Particles)
bei Capture Buffer Oligo-dT nicht vergessen !!!
(siehe BPZ)

Capture buffer	1	23 200 µl
+ Oligo dT		+ 19,3 µl
Wash buffer II	2	29 600 µl
Lysis buffer	3	-
DNase Solution	4	7 400 µl
Wash buffer I	5	14 000 µl
SMP	6	2 100 µl
Elution buffer	7	7 900 µl

DNase Solution : getrocknete DNase (RNase free) + 7 800 µl DNase Incubation buffer (4b)

Capture buffer :
Hybridization buffer(1b)
Oligo[dT] (1a)

for 8 isolations	for 16 isolations	for 24 isolations	for 32 isolations
7,3 µl	11,3 µl	15,3 µl	19,3 µl
8 800 µl	13 600 µl	18 400 µl	23 200 µl

Alles in Gerät einsetzen
Check-up !!

OK

Abbildung 13: Protokoll für MagNaPure RNA-Präparation

2.4.2. cDNA-Synthese mit reverser Transkription der RNA (AMV)

Erster Vorgang bei der RT-PCR: für die Synthese der Einzelstrang-cDNA wurde die bereits extrahierte total-RNA bzw. mRNA revers transkribiert. Dabei erzeugt das verwendete Enzym aus einer einsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang. Die eingesetzten Komponenten stammen aus dem AMV-RT-PCR-Kit der Firma Roche Diagnostics. Die hier verwendete reverse Transkriptase des „Avian Myoblastosis Virus“ besitzt neben Aktivitäten als RNA-/DNA-abhängige- DNA-Polymerase auch eine RNase-H-Aktivität, die zu einem spezifischen Abbau der RNA führt.

Dadurch werden Störfaktoren, die durch RNA-Verunreinigungen entstehen können, bei der nun folgenden RT-PCR minimiert.

Volumen	Substanz
2,1 µl	10x Reaktionspuffer
4 µl	25mM Magnesiumchlorid
2 µl	Desoxynucleotide Mix
2 µl	Random Hexamer-Primer bzw. spez. Primer
1 µl	RNase-Inhibitor
0,8 µl	H ₂ O (steril) für RT(-)
0,8 µl	AMV reverse Transkriptase für RT(+)

Abbildung 14: RT-PCR-Mastermix (Dr. Michael Knoll, FA Roche)

Zu 9,9µl der RNA-Präparation wurde nun jeweils 11,1µl des RT(-) bzw. RT(+) Mixes gegeben. Die 2 Negativ-Kontrollen (steriles Wasser statt Reverse Transkriptase) wurden als Kontaminationskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt. Dies diente als Nachweis der Reinheit der Kit-Komponenten, der Kontrolle einer DNA-freien RNA-Präparation sowie einer sauberen Arbeitsweise beim Ansatz des RT-PCR-Mixes. Nach Mischen und Zentrifugieren wurde der Ansatz im Thermocycler 10 min inkubiert. Während der Inkubation bei 25°C (Primer-Annealing) hybridisieren synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Sequenzen der DNA (Annealing) und ermöglichen die Kopie spezieller Bereiche durch die Taq-DNA-Polymerase (Elongation). Die Reverse Transkription fand bei 42°C über 60min statt. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.2.1. „1st Strand cDNA-Synthese Kit“ für RT-PCR (AMV)

Zum größten Teil wurde die cDNA mit Hexamer-Primern aus dem 1st Strand cDNA-Synthese-Kit für RT-PCR hergestellt (Random Hexamer p(dN)₆). Die Synthese der Einzelstrang-cDNA erfolgt mit diesem Kit durch die reverse Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV). Dabei erzeugt das Enzym aus der einsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang. Diese cDNA (engl. complementary DNA) ist für den weiteren Einsatz in der PCR-Technik (engl. polymerase chain reaction) geeignet.

2.4.2.2. cDNA-Synthese aus „LC-DPD mRNA Quantifikation Kit“

Spezifische Primer: cDNA-Synthese mit Komponenten aus dem neu konfektionierten Kit: „LC-DPD mRNA Quantifikation Kit“. Es wurden sequenz-spezifische Oligonucleotid-Primer verwendet. Damit konnte gewährleistet werden, dass während der reversen Transkription nur bestimmte gewünschte Zielsequenzen transkribiert und damit die Bildung unspezifischer cDNA-Produkte reduziert wird. Spezifische Primer waren zum einen (DPD:RT4) und (G6PDH:rev3).

2.4.3. Quantitative Real-Time PCR mit dem LightCycler®

Zweiter Vorgang bei der RT-PCR: um die mRNA-Expression von DPD quantitativ zu messen wurde nun die Anzahl der zuvor synthetisierten cDNA-Moleküle über Vervielfältigung (Amplifikation) im LightCycler® bestimmt.

Neu am LightCycler® System von Roche ist das Heiz- und Kühlsystem welches über heiße bzw. kalte Luft funktioniert, welche die in speziellen dünnwandigen Glaskapillaren (hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis) befindlichen, Proben sehr rasch auf die gewünschte Temperatur erhitzt bzw. kühlt. Dadurch kann mit diesem System eine sogenannte Echtzeit-PCR durchgeführt werden, die einen deutlich verringertem Zeitaufwand benötigt: d.h. 30 bis 40 Zyklen können in 20-30min laufen. Zudem können 32 Kapillaren gleichzeitig in einem Karussell platziert werden. (siehe Abb. 15)

LightCycler® System mit Probenkarussell, gefüllt mit Glaskapillaren
 Roche Molecular Biochemicals, Real-time PCR – as flexible as you are



Abbildung 15: LightCycler® von Roche

Ein PCR-Ansatz enthielt die in der unten in Abb.16 aufgelisteten Komponenten. Enthalten war jeweils ein Primer/Sonden-Paar: DPD oder G6PDH. Alle Proben wurden jeweils in zweifacher Version unter Mitführen einer Kalibrator-cDNA und 2 Negativ-Kontrollen gemessen.

Volumen	FastStart-Master-Mix (10µl je Reaktionsansatz)
2 µl	10x FastHybProbe-Master
2,4 µl	25mM Magnesiumchlorid
10µl	DNA/Primer-Ansatz
5,6 µl	H2O (steril)

Abbildung 16: Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Mix für PCR-Ansatz)

Zu jeweils 10µl des FastStart-Ansatzes wurden dann entsprechend jeweils 6µl des Detection Mixes pipettiert, sowie je eine Probe mit dem DPD-Kalibrator (pDPD) und dem G6-Kalibrator (pG6PDH) wie auch die beiden Negativ-Kontrollen sowie oben genannt paarweise die zu bestimmende cDNA-Probe.

Dem LightCycler® stehen verschiedene Fluoreszenzformate zur Verfügung um die Menge des gewünschten PCR-Produktes mit Fluoreszenzsignalen darzustellen. Bis dato war die gängigste und weit verbreitetste Methode die Geltrennung und Färbung von PCR-Produkten mit Ethidiumbromid. Dieses wird jedoch aufgrund seiner geringen Sensitivität und Spezifität im LightCycler®-System nicht verwendet. Die Verwendung eines doppelsträngigen DNA-Bindungsfarbstoffes (wie z.B. SYBR Green I) ist spezifischer, da er nur fluoresziert, wenn er an doppelstrang-DNA gebunden ist. Als sequenzspezifisches Format wird hier eine fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonde verwendet. Diese bietet eine maximale Spezifität für die Produktidentifizierung und kann eine bestimmte DNA-Sequenz nachweisen und quantifizieren. In dieser Arbeit werden zwei speziell entwickelte sequenzspezifische Oligonukleotidsonden verwendet, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Die Sequenzen der beiden Sonden werden so ausgewählt, dass sie in einer Kopf-Schwanz-Anordnung mit der Zielsequenz auf dem amplifizierten DNA-Fragment hybridisieren können. Der Donorfarbstoff (Fluorescein) wird von der blauen LED-Lichtquelle des LightCyclers® angeregt und emittiert grünes Fluoreszenzlicht mit einer etwas längeren Wellenlänge (530nm). Wenn sich beide Farbstoffe in unmittelbarer Nähe befinden (1 - max. 5 Nucleotide Abstand), regt die emittierte Energie des ersten den an die zweite Hybridisierungssonde gebundenen Farbstoff (Akzeptor) an, der dann fluoreszierendes Licht mit einer anderen Wellenlänge emittiert (hier LC Red 640nm).

Dieser als FRET (Fluorescence resonance energy transfer) bezeichnete Energietransfer hängt stark von dem Abstand zwischen den beiden Farbstoffmolekülen ab. Energie wird nur dann effizient übertragen, wenn sich die Moleküle in unmittelbarer Nähe befinden (1-5 bp). Die Menge / Intensität an Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an Ziel-DNA, die während des PCR-Processes erzeugt wird. Die Hybridisierungssonde 1 ist am 3'Ende mit Fluorescein mar-

kiert (Donor) und die Hybridisierungssonde 2 ist am 5'Ende mit LightCycler® Rot 640 (Akzeptor) markiert. Die Hybridisierung findet nicht während der Denaturierung statt, daher wird dann keine Fluoreszenz bei 640nm nachgewiesen. Nach der Denaturierung hybridisieren die Sonden (Annealing) bei 62°C in einer Kopf-Schwanz-Anordnung mit dem amplifizierten DNA-Fragment.

PCR-Schritt	Dauer /Temperatur	Wiederholung
Denaturierung	5 min / 95°C	1x
Amplifikation	10 s / 95°C Denaturierung 10 s / 62°C Primer-Annealing 10 s / 72°C Elongation	Je 40x
Abkühlen	Zieltemperatur: 40°C (30 s)	1x

Abbildung 17: Ablauf der PCR im LightCycler®

Fluorescein wird durch das LED-Licht des LightCyclers® angeregt und sendet grünes Licht aus. Die emittierte Energie regt das LC Red 640nm an, welches dann rotes Licht emittiert (siehe Abb. 18). Während der Elongation (Temperaturerhöhung) werden die Sonden von der DNA-Polymerase verdrängt. Diese Amplifikation wird 40x wiederholt. Das Signal wird einmal pro Zyklus vom Optiksensordes LightCyclers® gemessen. Abhängig von der Anfangskonzentration der zu messenden DNA-Sequenz beginnt die Zunahme der Signalintensität in verschiedenen Zyklen. Wichtig beim Arbeiten mit den Hybridisierungsproben ist, dass keine Fluoreszenz erkannt wird, wenn keine entsprechende Vorlage vorhanden ist.

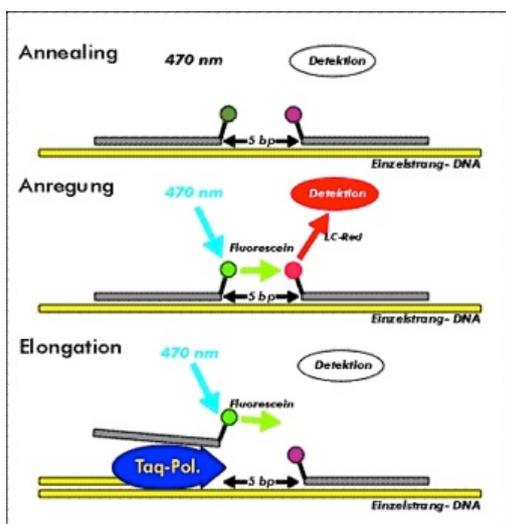


Abbildung 18: Prinzip der LightCycler® RT-PCR Methode

Die Intensität des emittierten Lichtes wird im Detektionssystem des LightCycler® gemessen und von der Software ausgewertet dargestellt. Die gemessene Fluoreszenzintensität, LC-Red 640 bei $\lambda=640\text{nm}$ ist proportional zur Anzahl der gebundenen Hybridisierungsproben und lässt auf die Kopienzahl des Templates schließen. So kann die PCR-Reaktion sowie die Zunahme der zu messenden DNA-Sequenz in „Echtzeit“ beobachtet und aufgezeichnet werden. Für jede Probe entsteht also ein charakteristischer Kurvenverlauf.

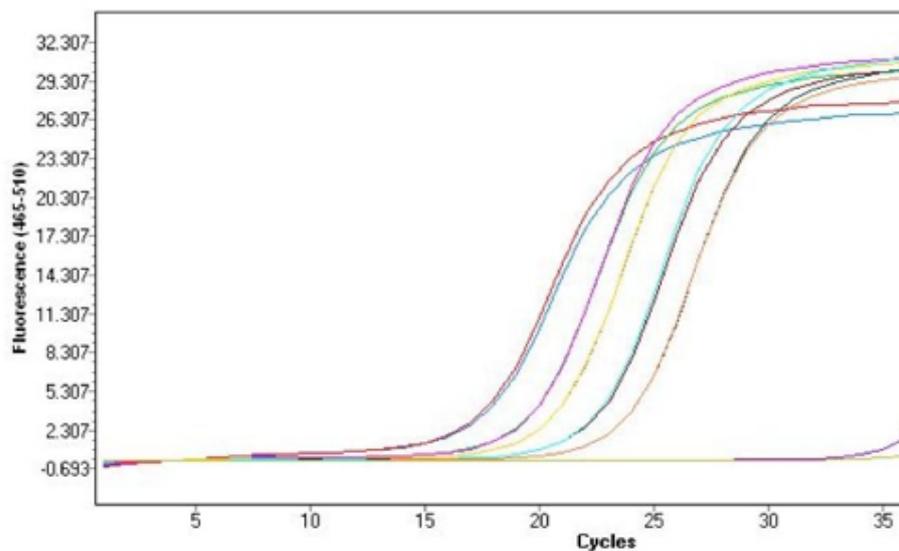


Abbildung 19: Kurvenverlauf RT-PCR im LightCycler®

2.4.4. Validierung der RT-PCR-Daten

Zur Bestimmung der Genauigkeit (Reproduzierbarkeit) der PCR-Messungen wurde sowohl von der Aufarbeitung des Blutes als auch von der RNA- und cDNA-Synthese mit anschließender RT-PCR-Auswertung jeweils ein Variationskoeffizient berechnet.

Dazu wurden vier zufällig gewählte Proben der WBC-Pellets parallel aufgearbeitet und mit PCR gemessen. (Probennummern 153, 162, 212 und 226)

Definition: Ein Variationskoeffizient ist ein Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert und damit gut geeignet zum Vergleich der Streuung verschiedener Variablen auch mit unterschiedlichen Einheiten ((43) Dr.S.Reese LMU München).

Die mRNA wurde mit dem MagNa Pure präpariert.

Magna Pure-Protokoll (mRNA 1 for Blood) ---> VK

Datum: 01.03.01

Experiment: Erstellung eines Variationskoeffizienten, um die Verlässlichkeit der Ratios zu testen
dazu werden 4 Proben je 8mal eingesetzt --> mRNA --> cDNA --> PCR

Vorgehen: Anschalten zuerst Gerät (ALF)
dann Monitor
dann Rechner

Magna Pure Version 2.1 anklicken
Start Programm

Handschuhe!

Kontrolle Flüssigabfal: ob der an seinem Platz und Füllzustand

Gerät reinigen: Bügel hoch
Pipettenhalterungen (gelb und blau) rausnehmen u Pipetten entfernen
Halterung für Lösungs-Rages rausnehmen

alles reinigen mit Papiertuch und DNA-Zap 1 zuerst
und dann mit DNA-Zap 2 nachwischen

alles wieder einsetzen und schließen

Sample ordering

Sample protokoll mRNA 1 for blood

Sample volumen 100 µl

Elutions volumen 50 µl

Proben-Namen eingeben:

H	G	F	E	D	C	B	A	
Probe 8	Probe 7	Probe 6	Probe 5	Probe 4	Probe 3	Probe 2	Probe 1	1
"	"	"	"	"	"	Probe 10	Probe 9	2
"	"	"	"	"	"	"	"	3
Probe 32	"	"	"	"	"	"	"	4

 ---> zu wenig Eluat; nur 3 Aliquots a' 10µl

Variationskoeffizient:

	Sample	~Zellzahl/ Pellet	Zugeben von MagnaPure mRNA LysisPuffer und gut mischen...	durch auf- und abpipettieren und vortexen	in Sample- Cartidge geben	Probenvolum en insgesamt 400µl	entspricht ca. Zellzahl von 0,5- 1Mio/Sample
Probe 1	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 2	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 3	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 4	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 5	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 6	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 7	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 8	PBL 153	ca.5,2 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 9	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 10	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 11	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 12	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 13	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 14	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 15	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 16	PBL 162	ca.5,0 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 17	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 18	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 19	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 20	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 21	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 22	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 23	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 24	PBL 212	ca.5,8 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 25	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 26	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 27	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 28	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 29	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 30	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 31	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	
Probe 32	PBL 226	ca.5,6 Mio		gut vortexen!	davon 100µl	300µl LP	

Start Batch

nun erscheint auf dem Bildschirm, was alles in das Gerät eingesetzt werden muß.
Pipettenspitzen, Behälter, Probencartridges,...
zuerst mit allen Plastikeinsätzen bestücken

dann Proben vorbereiten

und Lösungen* in die Behälter pipettieren (zuletzt : DNase Solution und SMP)
bei Capture Buffer Oligo-dT nicht vergessen !!! (siehe BPZ)

Alles in Gerät einsetzen
Check-up !!

OK

- * Capture Buffer ---> 23 200 µl HybridisationB + 19,3 µl Oligo-dT
- Wash Buffer 2 ---> 29 600 µl
- Lysis Buffer ---> wird schon zu den Proben gegeben
- DNase Solution ---> 7 800 µl Inkubationsbuffer in DNase-Fläschchen (rollern)
- Wash Buffer 1 ---> 14 000 µl
- SMP ---> 2 100 µl (vorher rollern!)
- Elutions Buffer ---> 7 900 µl

Abbildung 20: Protokoll mRNA-Präparation für Variationskoeffizient

Reverse Transkription mit AMV-RT-PCR-Kit

Datum: 01.03.01

Silvia Riemer

RNA-Präp.: RNA-Präparation der Proben 153,162,212,226
PBL's mittels "Magna Pure mRNA Isolation Kit 1 (blood)" (am 01.03.01-Alf)

RT-PCR-Mastermix alle Komponenten aus dem LC-DPD mRNA Quantifikation Kit außer RT-Puffer (10x)
(Cat.-Nr.:3 136 957) 1st Strand Kit

RT-PCR-Mastermix	1 Ansatz in µl	25 Ansätze in µl
10x Reaktionspuffer	2,1	52,5
25mM Magnesiumchlorid	4	100
Deoxynucleotide Mix	2	50
Random Hexamer-Primer *	2	50
RNase-Inhibitor	1	25
Summe:	11,1	277,5

RT-Mastermix in zwei Ansätze teilen:

0 Tubes RT(-) 0 µl RT-PCR-Mastermix + 0,00 µl H2O(steril)
25 Tubes RT(+) 275 µl RT-PCR-Mastermix + 20,00 µl AMV

9,9µl gesRNA-Präparationen auf Eis (!) auftauen
zu jedem Ansatz 11,1µl entsprechend nachstehender Liste RT(-) und RT(+)-Mix geben:

RNA-Präp.	RT(-)/RT(+)	RNA-Präp.	RT(-)/RT(+)
Calibr.	RT(+)	162	RT(+)
Calibr.	RT(+)	162	RT(+)
Calibr.	RT(+)	162	RT(+)
153	RT(+)	162	RT(+)
153	RT(+)	162	RT(+)
153	RT(+)	212	RT(+)
153	RT(+)	212	RT(+)
153	RT(+)	212	RT(+)
153	RT(+)	212	RT(+)
153	RT(+)	212	RT(+)
162	RT(+)	212	RT(+)
162	RT(+)	212	RT(+)

Ansatz durch Auf- und Abpipettieren mischen

Inkubation des Ansatzes für 10min auf 25°C (Primer-Annealing), dann 60min bei 42°C (Reverse Transkription)

Inkubation des Ansatzes für 5min auf 94°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase, sofort auf Eis
cDNA-Ansatz bei -20°C lagern

Abbildung 21: cDNA-Synthese für Variationskoeffizient

Light-Cycler-Lauf (HybProbes)

Datum: 01.03.01

10x Master: aus dem LC-DPD mRNA Quantification Kit (Cat.No. 3 136 957)

cDNA/DNA: RNA-Präp. Magna Pure mRNA-Kit-1 aus PBL's 153 (7x) ---> Variationskoeffizient!
 cDNA-Synthese vom 01.03.01 mit LC-DPD...Kit (auch 7x)
 statt 5x- → 10x RT-Puffer (aus 1st Strand cDNA-Synth.Kit for RT-PCR...AMV)
 Cat-Nr.:siehe 25.01.01/Protokoll

Software: LC-Programm (.exp): EnzymKitPrg
 Daten (.abt, .flo, .tem):

Master:	3mM MgCl ₂ 1 Ansatz in µl	Caps	DPD	G6PDH
			3mM MgCl ₂ 17 Ansatz in µl	3mM MgCl ₂ 17 Ansatz in µl
60µl FastStart 3b in 3a pipettieren, durch Auf-/ und Abpipettieren mischen				
FastStart Reaction Mix	2	3a red cap	34	34
25mM Magnesiumchlorid	1,6	11 colorless	27,2	27,2
DNA/Primer-Ansatz	10			
H ₂ O (steril)	6,4	10 colorless	108,8	108,8
Detection Mix	6	1/2 green/yellow	102	102

zuerst 16µl Mastermix in die Kapillaren pipettieren
 dann 4µl cDNA zugeben

Ansatz		cDNA/DNA. µl	Master Mixes	Wasser µl	Kap. Nr.	LC- Pos.
DPD	Calibrator	4	16	0	11	1
DPD	Calibrator	4	16	0	12	2
G6PDH	Calibrator	4	16	0	13	3
G6PDH	Calibrator	4	16	0	14	4
DPD	PBL 153	4	16	0	15	5
DPD	PBL 153	4	16	0	16	6
G6PDH	PBL 153	4	16	0	17	7
G6PDH	PBL 153	4	16	0	18	8
DPD	PBL 153	4	16	0	19	9
DPD	PBL 153	4	16	0	20	10
G6PDH	PBL 153	4	16	0	21	11
G6PDH	PBL 153	4	16	0	22	12
DPD	PBL 153	4	16	0	23	13
DPD	PBL 153	4	16	0	24	14
G6PDH	PBL 153	4	16	0	25	15
G6PDH	PBL 153	4	16	0	26	16
DPD	PBL 153	4	16	0	27	17
DPD	PBL 153	4	16	0	28	18
G6PDH	PBL 153	4	16	0	29	19
G6PDH	PBL 153	4	16	0	30	20
DPD	PBL 153	4	16	0	31	21
DPD	PBL 153	4	16	0	32	22
G6PDH	PBL 153	4	16	0	33	23
G6PDH	PBL 153	4	16	0	34	24
DPD	PBL 153	4	16	0	35	25
DPD	PBL 153	4	16	0	36	26
G6PDH	PBL 153	4	16	0	37	27
G6PDH	PBL 153	4	16	0	38	28
DPD	PBL 153	4	16	0	39	29
DPD	PBL 153	4	16	0	40	30
G6PDH	PBL 153	4	16	0	41	31
G6PDH	PBL 153	4	16	0	42	32

Abbildung 22: Ansatz für den LightCycler® am Beispiel der Probe Nr. 153 für Variationskoeffizient

2.5. ELISA: DPD-Messung auf Proteinebene

ELISA (=Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) für die quantitative Bestimmung von DPD in den PBMNC's auf Proteinebene.

Dazu wurden die gewonnenen Zellpellets aus PBMNC's in jeweils 800 µl TBS-Puffer resuspendiert und die Zellen über dem Sonifeyer (Ultraschall/Labsonic von Braun) lysiert (3x10min/auf Eis; Einstellung zwischen 3 und 4). Nach Zentrifugation bei 10 000 rpm über 6min wurde der Überstand aliquotiert, schockgefrohren und bei -20°C gelagert.

2.5.1. Allgemeine Proteinbestimmung des Zellysates nach BRADFORD

Die Proteinbestimmung von Zell-Lysaten im Bio-Rad-Protein-Assay:

Einsatzstoffe: Zell-Lysate, Bio-Rad-Reagenz, Precimat, TBS (Tris-Buffered-Saline), VE-Wasser

Durchführung: Precimat c=60mg/ml mit VE-Wasser auf 0,1mg/ml verdünnen (1µl Precimat + 600µl VE-Wasser) = Standard.

Reagenzlösung herstellen: je Probe 200µl Bio-Rad-Reagenz + 800µl VE-Wasser (Gesamtlösung für 10 Zell-Lysate: 40ml VE-Wasser + 10ml Bio-Rad-Reagenz => 1ml/Küvette vorlegen, dazu Probe pipettieren).

Bei jeder Messung wird gegen den Reagenzienleerwert gemessen (200µl Bio-Rad-Reagenz + 800µl VE-Wasser + 5µl TBS).

Standard messen: 20µl, 40µl, 60µl, 80µl, 100µl einsetzen, gut mischen, 5min inkubieren und bei 595nm am Photometer messen.

Probenmessung: z.Bsp. 10 Proben mit Reagenzlösung ansetzen (jeweils 2µl und 4µl einsetzen), gut mischen, 5min inkubieren, und bei 595nm am Photometer messen.

Die Daten der Proteinbestimmung wurden jeweils in einem Bezugskurvenprogramm ausgewertet (BEZUKULI).

2.5.2. Bestimmung der DPD-Konzentration mit dem ELISA-Kit

In Relation zur Gesamtproteinkonzentration wurde nun von jeder Zellprobe die DPD-Konzentration bestimmt. Die Proben wurden jeweils doppelbestimmt und im Vergleich zu einer Positivkontrolle (PK) sowie zu den vorgegebenen Standards (St. a-f) gemessen.

Herstellung der Sample buffer aus dem vorgegebenen Kit:

0,3ml wegnehmen und verwerfen, 0,3ml Casein-Lösung(6) zugeben – gut verrühren!

Einzusetzende Proben verdünnen:

1:2,5 – d.h. 75µl Sample Buffer mit 50µl der Probe

Positivkontrolle verdünnen:

1:5 – d.h. 20µl PK mit 80µl Sample Buffer

Vorbereitung der Mikrotiterplatte (MTP) bestehend aus 8x12 Fächern:

In alle Felder 100µl Sample Buffer geben, außer in die beiden Negativkontrollen („Blank“), jeweils 50µl von jeder Probe zu pipettieren sowie die Standards (a-f) und die Positivkontrolle.

Sodann die MTP mit Folie abdecken und über 2h bei 37°C und 300rpm inkubieren.

3x Waschen mit jeweils 300µl WashBuffer(7) und jeweils ausklopfen.

Anti-DPD-HRP (2) in 500µl bidest. Wasser lösen und 10min rollern. Davon 200µl in 15,8ml Inkubationspuffer (4) geben und gut rühren!

Jeweils 150µl (Immunoreagenz) in die MTP geben – außer bei „Blank“!

Die Platte wiederum 1h bei 15-25°C (Raumtemperatur) und 300rpm inkubieren.

Nochmals jeweils 3x mit Waschpuffer waschen und ausklopfen.

In jedes Fach jeweils 200µl ABT-Substrat zugeben (=Farbstoff), Stoppuhr starten und die Platte auf den Schüttelinkubator legen (300rpm).

Alle 10min erfolgt eine photometrische Messung bei 405nm (Referenzbereich 490nm) über ca. 60min lang.

Messbereich DPD: 0-80ng/ml, 1ng/ml entspricht 0,17U/ml

Der durchschnittliche Variationskoeffizient des DPD-ELISA`s einschließlich Probenvorbereitung beträgt weniger als 8,5% (Anhang: Poster, Roche).

Die Probenaufarbeitung fand durch Karin Listringhaus (Arbeitsgruppe Prof. H. Stockinger / Roche, Penzberg) statt.

2.6. Aktivitätsbestimmung von DPD (Prof. R. B. Diasio/USA)

Insgesamt konnten von dem Probandenpool (n=245) der Firma Roche noch 167 Proben für die Aktivitätsanalyse verwendet werden.

Die analysierten Aktivitätsdaten aus diesen 167 Proben stammen hiermit aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Probanden.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Labor von Prof. Robert B. Diasio (University of Alabama at Birmingham /USA) nach einer neuen Standardmethode mit einem dafür entwickelten DPD-Assay mittels HPLC (high performance liquid chromatography) mit einem „radioisotope flow detector“ wie bei Johnson M.R. (1997) (30) beschrieben. In dieser Studie verwendet Johnson *et al.* 1997 (30) einen neuen HPLC-basierten, halbautomatischen Radio-Assay zur Messung der DPD-Aktivität in PBMNC`s des menschlichen Blutes. Die Einordnung und Quantifizierung der Peaks wurde mit der flow-one-Software berechnet, die mit dem Online-Radioisotop-Durchflussdetektor geliefert wurde. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Probandenproben wurde gebildetes Dihydrofluorouracil in nmol (y) gegen die Zeit (x) aufgetragen. Die Steigung dieses Graphen wurde dann mit linearer Regressionsanalyse berechnet. Diese Steigung wiederum wurde dann durch die jeweils entsprechende Proteinmenge geteilt, um das Endergebnis zu erhalten (DPD activity expressed as nmol/min/mg protein) ((30) Johnson MR, *et al.* 1997). Die minimale Nachweisgrenze für dieses Testsystem wurde auf 0,005 nmol Dihydrofluorouracil herabgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Präparationsvarianten

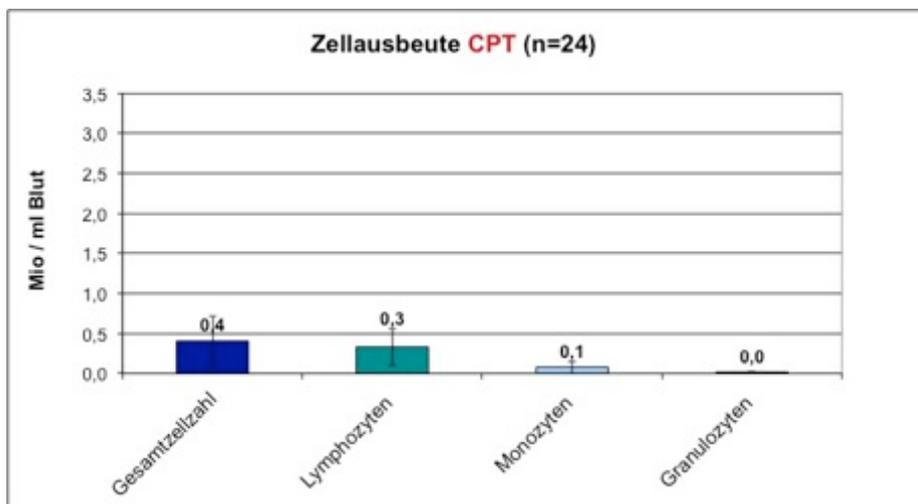
3.1.1 Auswertung der Zellisolationsvarianten (Vorversuch)

Als Vorversuch wurde ein Zellzahlvergleich der Zellausbeute aus den drei verschiedenen Aufreinigungsmethoden: CPT-Vakutainer, Greiner, Erythrozytenlyse durchgeführt (n=24 Probanden). Es wurden jeweils die PBMNC's von 19 freiwilligen Probanden (ausgezählt: klinische Chemie - Rdl) und 5 Probanden der Firma Roche (ausgezählt mit FACS) bestimmt. Insgesamt wurden bei allen Probanden die gleichen Verhältnisse an Zellzahlen erreicht.

Zusammengefasst ergaben sich folgende Ergebnisse für die drei Aufreinigungsmethoden:

Für die Zellausbeuten der Blutproben insgesamt ergaben sich folgende Zellzahlen: Die höchste Zellausbeute an White blood cells (WBC's) lies sich mit der Erythrolyse erreichen.

Die CPT-Vakutainer ergaben insgesamt die geringste Ausbeute an WBC's.



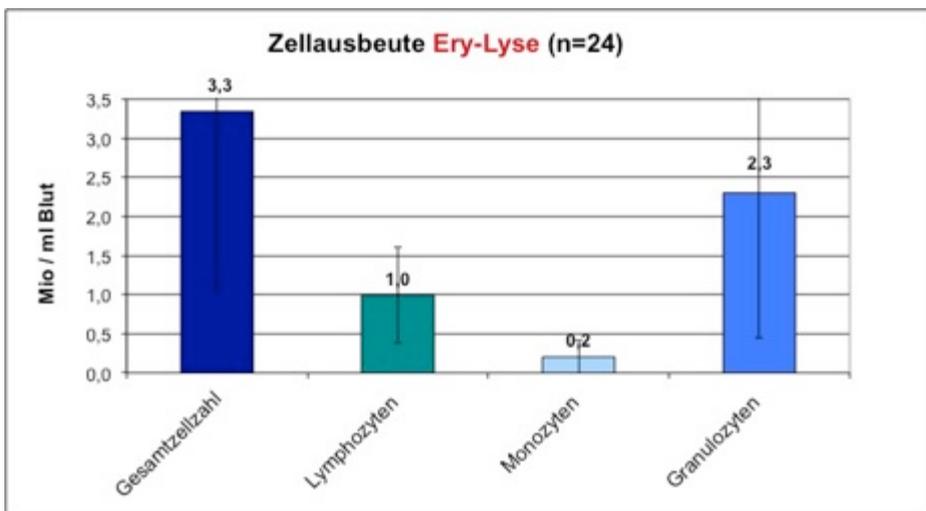
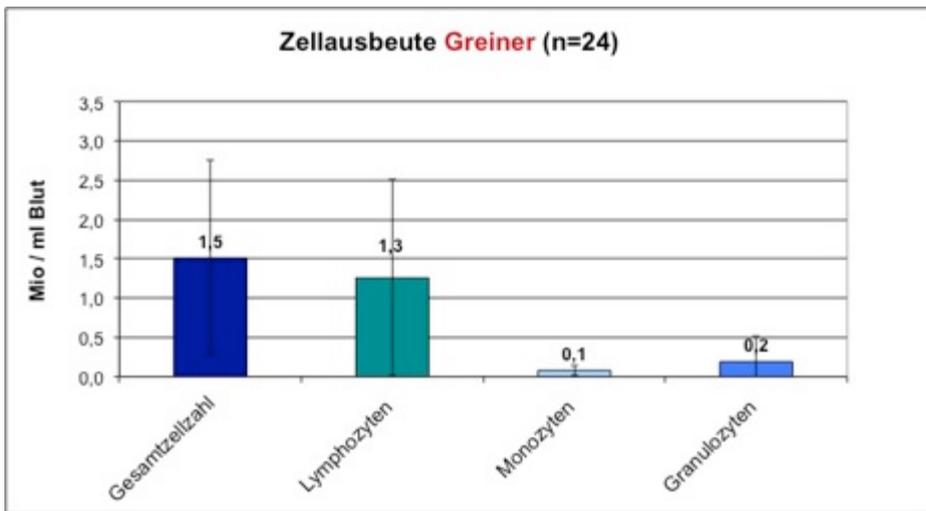
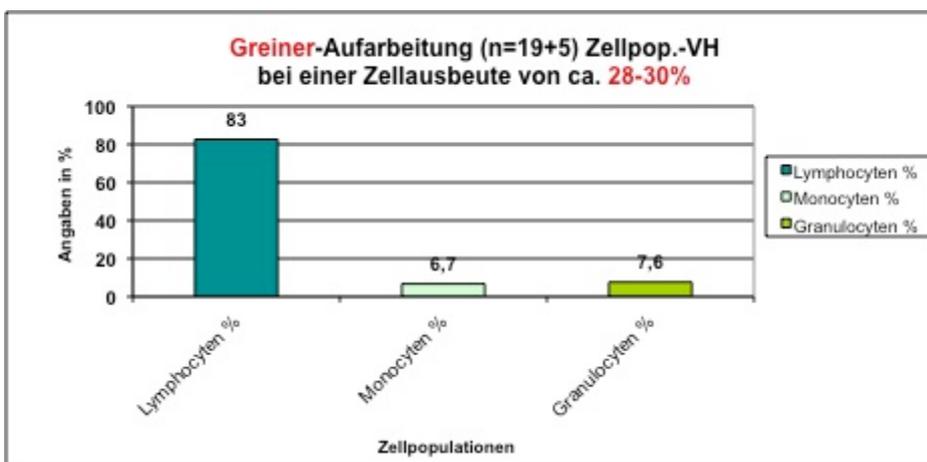


Abbildung 23 a,b,c: Zellausbeute (WBC) der 3 verschiedenen Aufreinigungen

Eine Aufspaltung in die unterschiedlichen WBC's ergab folgende Ergebnisse:



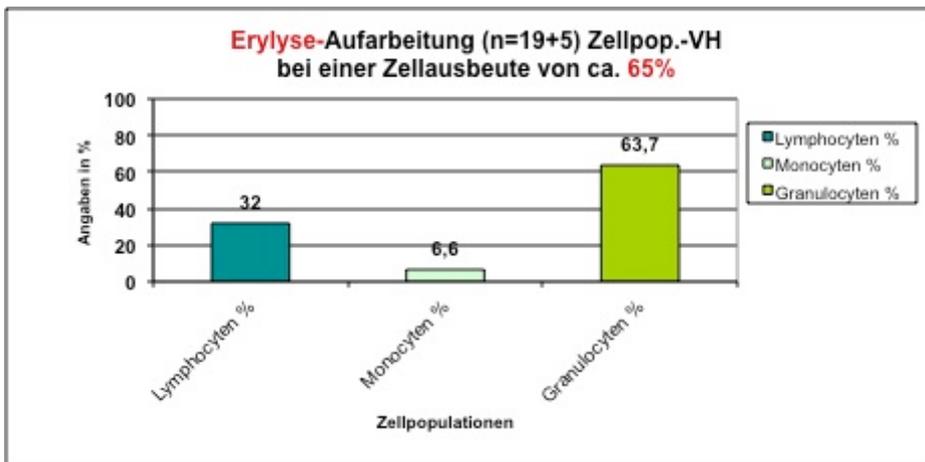


Abbildung 24 a,b: Aufteilung der WBC in Lympo-, Mono-, Granulozyten

Zusammengefasst erzielte die Erythrozyten-Lyse zwar die größte Zellausbeute bei jedoch auch dem größten Anteil an verunreinigenden Granulozyten (ca. 60%), welche für die vergleichende DPD-Analyse störend wirken.

Laut Van Kuilenburg ABP (1998) (38) wurde bei der Analyse der DPD-Aktivität in den WBC's die höchste Aktivität in den Monozyten gefunden, gefolgt von Lymphozyten. Am wenigsten Aktivität fand sich in den Granulozyten sowie in Thrombozyten. Deshalb, und um eine Verunreinigung der Proteinanalyse durch die vielen Granulozyten auszuschließen, wurde von den drei Methoden der PBMNC-Isolierung aus Vollblut die Ficoll-Überschichtung als in der Durchführung praktikabelste, kostengünstigste und im Ergebnis beste Lösung erwogen.

3.2. Auswertung der PCR-Daten

Für die DPD mRNA-Analyse wurde ein neuer Echtzeit RT-PCR-Test auf dem LightCycler® entwickelt, der eine schnelle, genaue und hoch reproduzierbare Quantifizierung von DPD-mRNA in Forschungsproben aus PBMNC's und auch Gewebeproben ermöglicht. Für die Populationsstudie wurde mRNA aus frisch gefrorenen PBMNC's von 230 gesunden Probanden der Fa. Roche zur DPD-Quantifizierung verwendet. Die Analyse der Verwendung von zufälligem Hexamer-Priming gegenüber spezifischem Priming für die cDNA-Synthese ergaben identische Ergebnisse (siehe 3.2.2.).

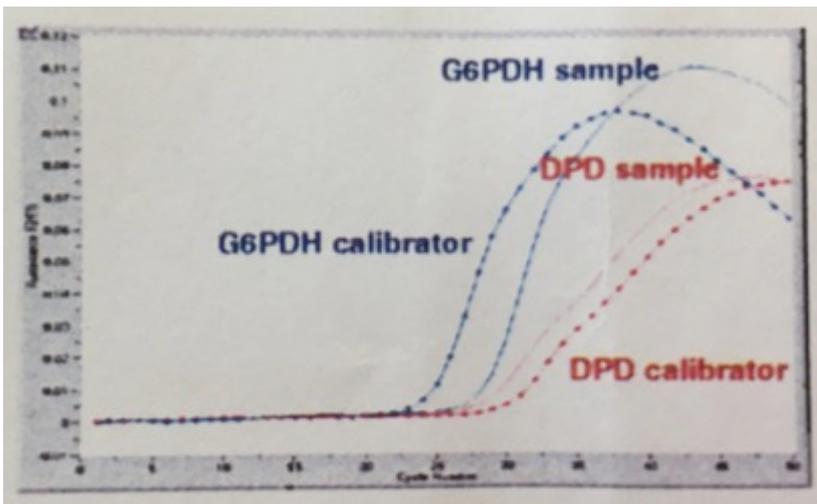


Abbildung 25: Amplifikation und Nachweis von DPD mRNA und G6PDH mRNA mit dem LightCycler® DPD Quantifizierungskit

Das Amplifikationsprofil von DPD-cDNA und G6PDH-cDNA einer PBMNC-Probe sowie des Kalibrators ist hier als Beispiel dargestellt (siehe Anhang: Poster).

Basierend auf der Bestimmung der Crossing points (CP) durch das Maximum der zweiten Ableitung wurde ein Verhältnis für DPD-mRNA von 29.5 unter Verwendung des relativen Quantifizierungstools berechnet.

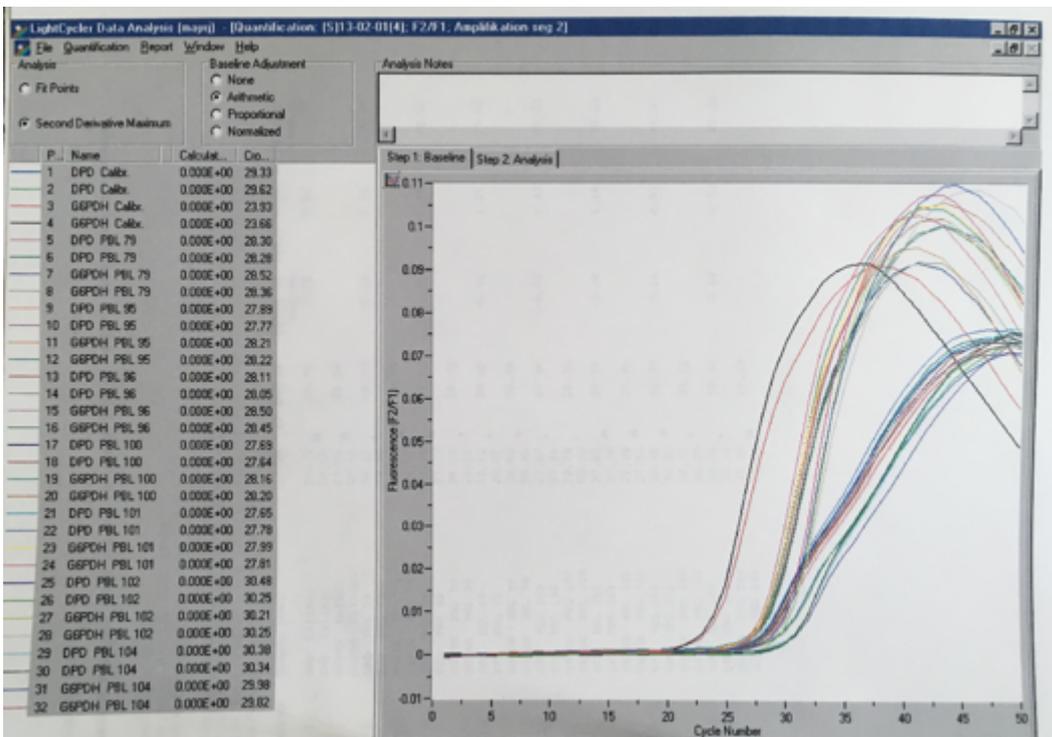


Abbildung 26: Kurven vom LightCycler®lauf 79-104 mit CP der Kalibratoren von G6PDH bei 23.7 und DPD bei 29.5 sowie den dazu gemessenen Proben (79,95,96,100,101,102,104)

Die statistische Analyse hier im Frequenzhistogramm für die gesamte gemessene Population (n=230) zeigt eine unimodale Verteilung der DPD-mRNA-Expression, die zu einer normalen (Gauß'schen) Verteilung passt.

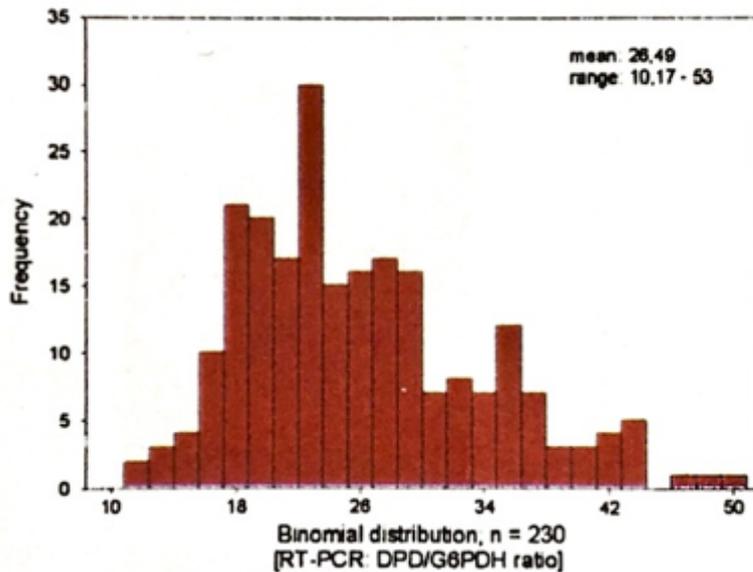


Abbildung 27: Histogramm über die Verteilung der DPD mRNA in PBMNC's (n=230) / Poster

Das mittlere DPD-Verhältnis (Ratio) aus den PBMNC's relativ zum Kalibrator ist 26.49 +/-8.2 mit einem gemessenen Bereich von 10.17 bis 53 (siehe Anhang: Poster).

3.2.1. Auswertung: Total-RNA versus mRNA

Aus allen Proben wurden 28 Proben zufällig ausgewählt, woraus jeweils Analysen von Vollblut vs. PBMNC's sowie auch jeweils die Aufbereitung der gesamten RNA vs. mRNA, sowie die Analysen mit Hexamer Primern vs. spezifischen Primern durchgeführt und verglichen werden konnte. Die Gesamt RNA wurde wie in Material/Methoden genannt mit dem High-Pure RNA-Isolation Kit (Roche) präpariert.

Die mRNA wurde jeweils mit MagNa-Pure mRNA-Isolation Kit I (Roche) präpariert. Aus den RNA's wurde jeweils die cDNA einmal mit Hexamer-Priming und einmal mit spezifischem Priming hergestellt. Diese Proben wurden wiederum alle auf dieselbe Art und Weise – bzgl. DPD – im LightCycler® gemessen.

Die Ratios sind auf den nun folgenden Diagrammen zu sehen.

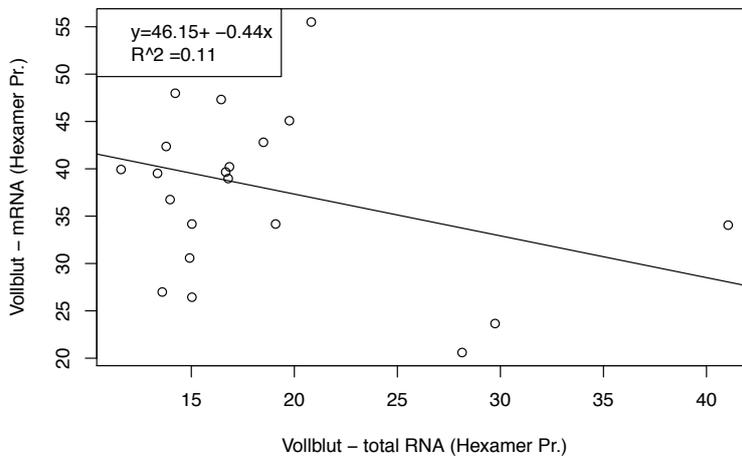


Abbildung 28: Vergleich PCR-Ratios DPD aus Vollblut: Gesamt-RNA vs. mRNA

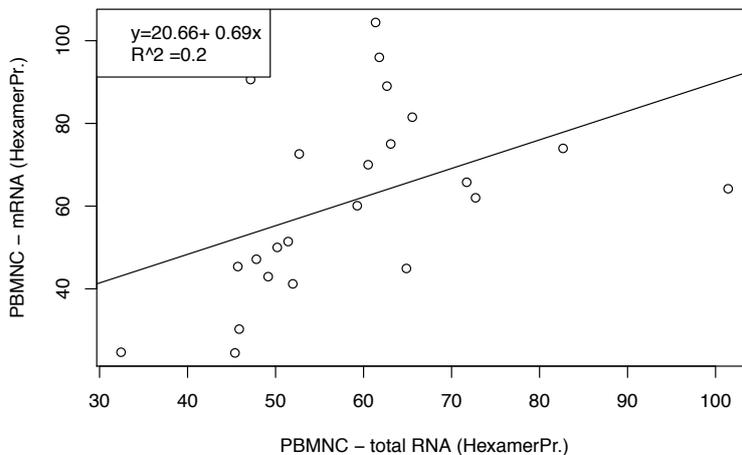


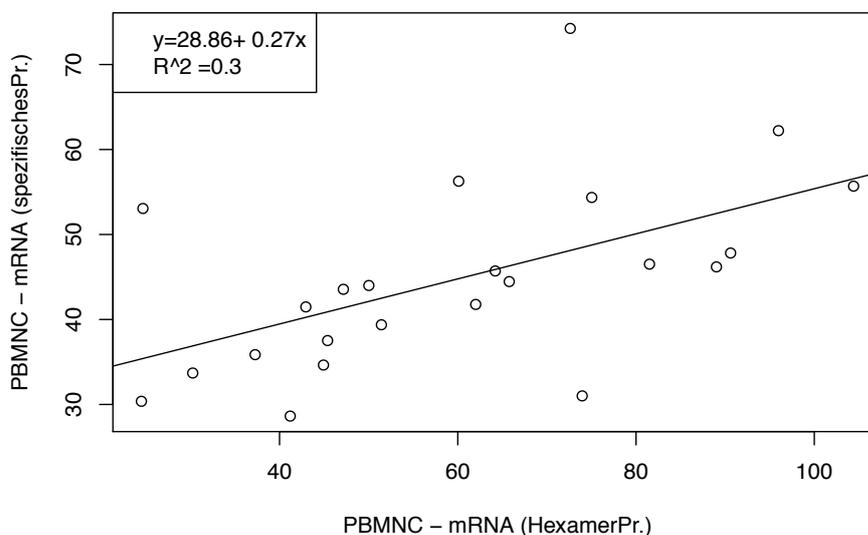
Abbildung 29: Vergleich PCR Ratios DPD aus PBMNC: Gesamt-RNA vs. mRNA

Die Auswertung wurde statistisch mit einer linearen Einfachregression versucht (Alain Hamid, Statistiker Uni Augsburg). Die Grundidee der linearen Regression ist es eine Gerade zu suchen, die den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen möglichst gut beschreibt. (Prof. Dr. W. Ludwig-Mayerhofer, Statistik, Uni Siegen). Der Determinationskoeffizient R-Quadrat (Bestimmtheitsmaß) ist ein Maß (aus der Varianzanalyse berechnet), welches das Ausmaß angibt, in dem die Streuung in den Daten durch das Modell (Regressionsmodell) erklärt wird.

R^2 kann als Anteil erklärter Varianz interpretiert werden und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. $R^2 = 0$ bedeutet, dass die unabhängigen Variablen keine Vorhersage der Zielvariablen erlauben. $R^2 = 1$ weist auf eine perfekte Modelanpassung hin. (eswf.uni-koeln.de/glossar/node101.html). Man kann auch sagen: R^2 gibt an, wie groß der Anteil der gemeinsamen Varianz von zwei Variablen ist. $(1-R^2)$ ist dann der Anteil, der den beiden nicht gemeinsam ist, der also durch irgendwelche anderen (meist unbekannt) Variablen erklärt werden müsste oder aber spezifisch für eben diese beiden Variablen ist. Z.B.: Eine Korrelation, die auf den ersten Blick noch relativ brauchbar erscheint $r=0,30$ wird durch Berechnung von r^2 erkennbar gering ($=0,09$). Es ergibt sich also eine weniger als 10% gemeinsame Varianz und ein über 90% unbekannter „Fremdanteil“ bzw. spezifischer Anteil. (Lernstats – interaktives Lernprogramm zur Statistik). Somit lässt sich aus den beiden oben angezeigten Graphen also schließen, dass aus unseren Messungen zwischen der gemessenen mRNA und total RNA im Vollblut so gut wie keine Korrelation, in den PBMNC's zumindest eine leichte Korrelation nachgewiesen werden kann.

3.2.2. Auswertung: Hexamer vs. spezifisches Priming

Für die gegenüberstellende Messung der 28 ausgewählten Proben wurde jeweils bei der reversen Transkription mit AMV ein spezifischer Primer: DPD/RT4 (von Roche hergestellt) sowie ein Random Hexamer Primer, verwendet.



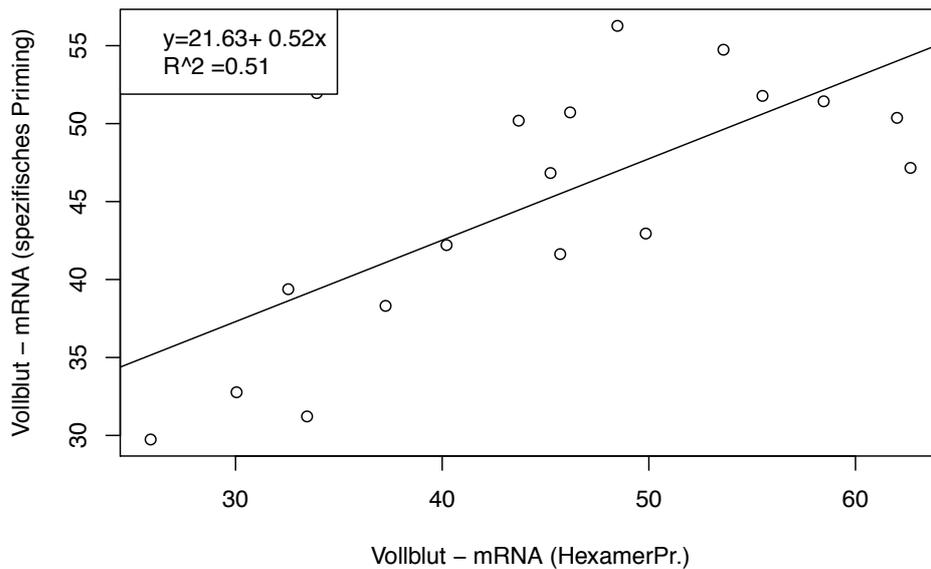


Abbildung 30 a,b: Vergleich PBMC's und Vollblut PCR-Ratios-DPD: spez. Primer vs. Hexamer Primer

Hier ließ sich für die Verwendung von spezifischen Primern vs Hexamer Primern eine gute Korrelation zeigen.

3.2.3. PCR-Validierung: Variationskoeffizient

Beschreibung des Vorgehens zum Erstellen eines Variationskoeffizienten siehe Material und Methoden (2.4.4.). Folgend die Ergebnisauswertung: Qualitätsbewertungsdaten für DPD-mRNA-Messung mit RT-PCR:

LC-Daten : VariationsKoeffizient von 4 Proben (a' 7 Aliquots)

Datum:	01.03.01							Mittelwert	STABW	VK
Proben-Nr:	Calibr.	153	153	153	153	153	153			
CP-DPD		29,54	28,41	28,09	27,88	28,36	28,02	28,52	27,86	
CP-G6PDH		23,92	28,65	28,59	28,08	28,28	28,5	28,47	28,07	
Ratio		1	58,06	69,52	56,08	46,67	68,56	47,49	56,86	57,61 9,01 16%

Datum:	01.03.01							Mittelwert	STABW	VK
Proben-Nr:	Calibr.	162	162	162	162	162	162			
CP-DPD		29,35	30,52	30,2	30,56	30,2	30,09	30,3	29,86	
CP-G6PDH		23,94	29,86	29,73	29,91	29,67	29,93	29,9	29,33	
Ratio		1	26,81	30,47	26,99	29,44	38,17	32,1	29,54	30,50 3,86 13%

Datum:	05.03.01							Mittelwert	STABW	VK
Proben-Nr:	Calibr.	212	212	212	212	212	212			
CP-DPD		29,68	29,91	30,31	30,62	30,78	30,52	30,61	30,45	
CP-G6PDH		23,99	30,33	30,47	30,69	30,75	30,74	30,7	30,72	
Ratio		1	68,33	57,66	53,98	50,19	59,69	55,12	62,01	58,14 5,93 10%

Datum:	05.03.01							Mittelwert	STABW	VK
Proben-Nr:	Calibr.	226	226	226	226	226	226			
CP-DPD		29,69	29,16	29,18	29,35	29,3	29,27	29,41	29,41	
CP-G6PDH		24,05	29,15	28,83	28,98	29,11	29,19	29,41	29,41	
Ratio		1	49,5	39,25	38,44	43,7	46,83	49,85	44,60	4,98 11%

Abbildung 31: Variationskoeffizient RT-PCR

Der Variationskoeffizient bewertet die Qualität der Daten aus der Quantifizierung der DPD mRNA mittels RT-PCR. Wie bereits in Material und Methoden erklärt, wurde um den Variationskoeffizienten zu bestimmen, aus 4 Proben 7x mRNA unabhängig isoliert. Jede mRNA wurde zu cDNA revers transkribiert und jede doppelsträngige cDNA wurde mit dem LightCycler® 2x parallel analysiert. Es ergab sich im Mittel ein Variationskoeffizient (relatives Streuungsmaß) von 12,5%

3.3. Auswertung ELISA-Daten

Das von DPD-ELISA ermittelte Frequenzhistogramm für die DPD-Proteingehalte der PBMNC-Lysate der hier gemessenen gesamte Population (n=199) zeigt ebenfalls eine unimodale Verteilung, die zu einer Gaußverteilung passt, jedoch mit einer leichten Linksverschiebung im Vergleich zur PCR. Die mittlere DPD-Proteinkonzentration in den PBMNC's beträgt: 198,5 +/-149,4 ngDPD/mgProtein mit einem Messbereich von 25 bis 726 ngDPD/mgProtein.

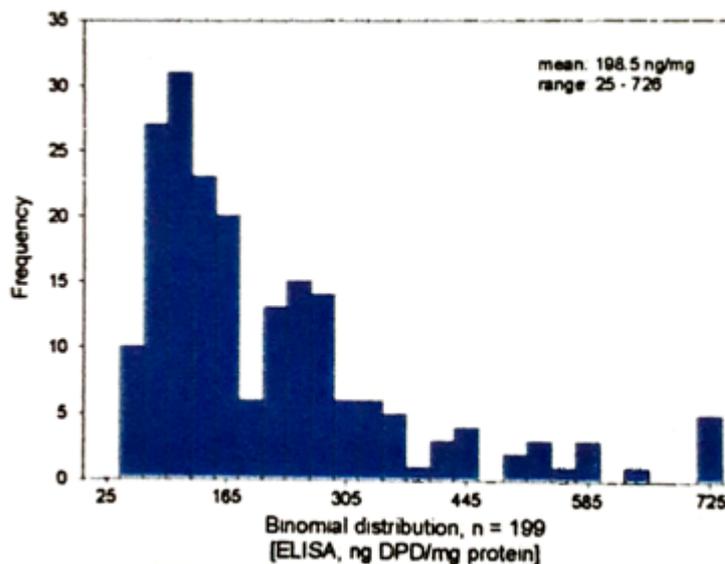


Abbildung 32: Histogramm über die Verteilung des DPD-Proteinexpressionsniveau in PBMNC's (Poster)

Im Zusammenhang lässt sich aussagen, dass sich aus all unseren gemessenen Daten **keine** Korrelation zwischen der DPD-mRNA Expression und der DPD-Protein Expression in den PBMNC's ergibt.

Ob dieses Ergebnis auf posttranslationale Vorgänge im DPD-Enzym oder auf die Aufbereitungsverfahren der Proben zurückzuführen ist, wäre noch zu untersuchen.

3.4. Auswertung der Aktivitätstest-Daten

Die Aktivitätsmessung fand im Labor der University of Alabama at Birmingham, Department of Pharmacology & Toxicology unter Ph.D. Martin Johnson und M.D. Robert Diasio statt. Die übermittelten Daten der dort gemessenen 167 Probanden ergaben folgende Verteilung.

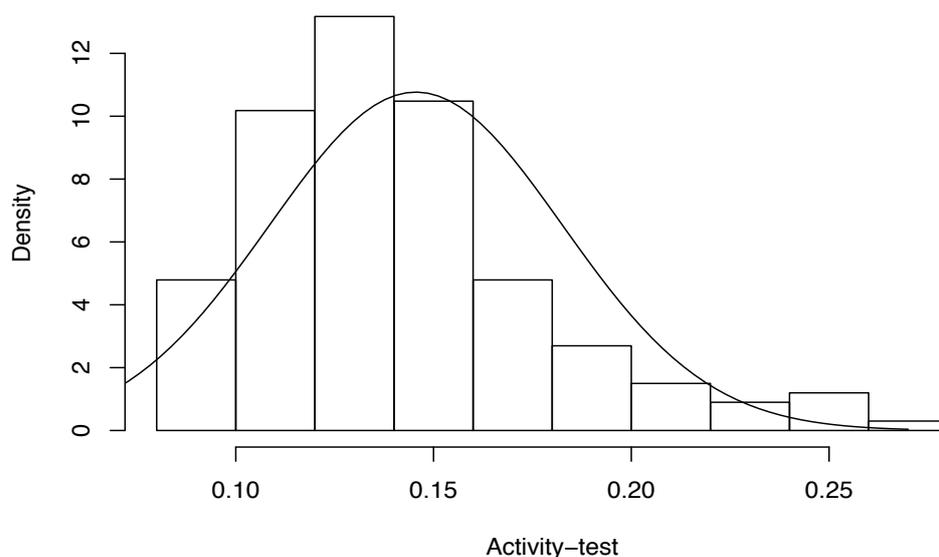


Abbildung 33: Verteilung/ Histogramm Aktivitätstest DPD (n=167) in nmol/min/mg Protein (x-Achse)

Die erhaltenen Werte zeigen eine Spanne von 0,08nmol/min/mg Protein bis 0,25nmol/min/mg Protein mit einem Mittelwert von 0,143nmol/min/mg Protein. Der untere Wert des Referenzbereiches, ab dem man von potentieller DPD-Insuffizienz sprechen kann, liegt bei 0,06nmol/min/mg Protein. ((30) Johnson MR *et al.* 1997, (44) Mattison LK, Fourie J, Diasio RB *et al.* 2006).

Dieser Grenzwert wurde hier somit von keinem der untersuchten Probanden unterschritten. Die Verteilung der Aktivitätswerte (siehe Abb. 33) kommt hier graphisch als Normalverteilung und somit als Gauß'sche Glockenkurve zur Darstellung.

3.5. Korrelationsversuch der 3 Messmethoden

In unseren Daten zeigte sich bei einem Vergleich der Messungen von DPD-mRNA Expression und DPD-Proteingehalt in PBMNC's **keine** Korrelation (Poster, Roche, siehe Anhang). Auch im Vergleich beider Messergebnisse mit den erhaltenen Ergebnissen aus dem Aktivitätstest lässt sich keine Korrelation erkennen.

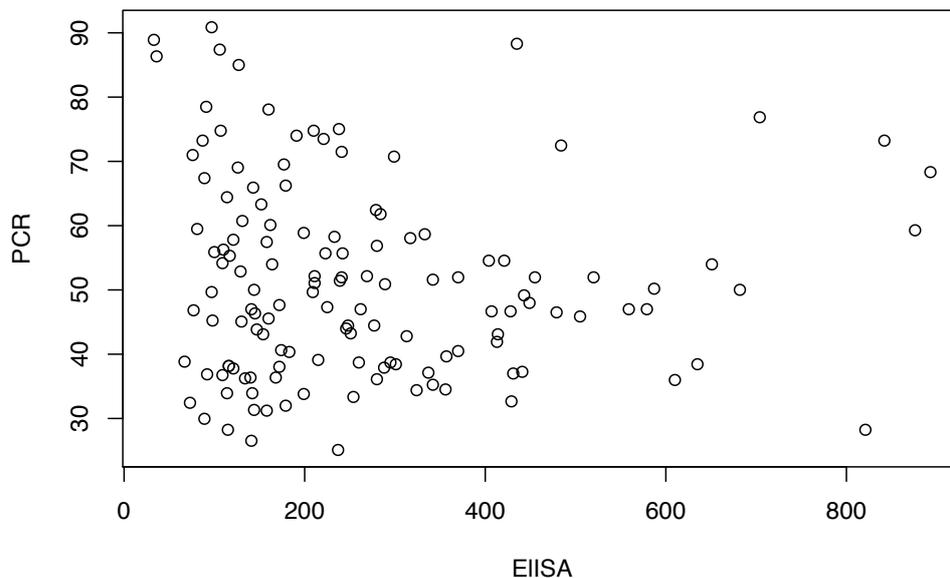


Abbildung 34: PCR CP-Ratio von DPD/G6PDH vs. ELISA DPD ng/mg Protein

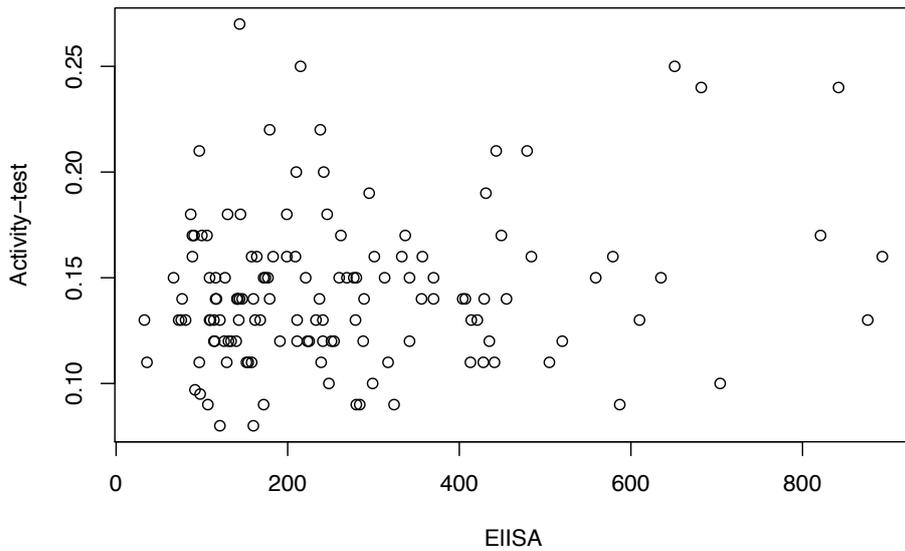


Abbildung 35: DPD-Aktivität nmol/min/mg vs. ELISA DPD ng/mg Protein

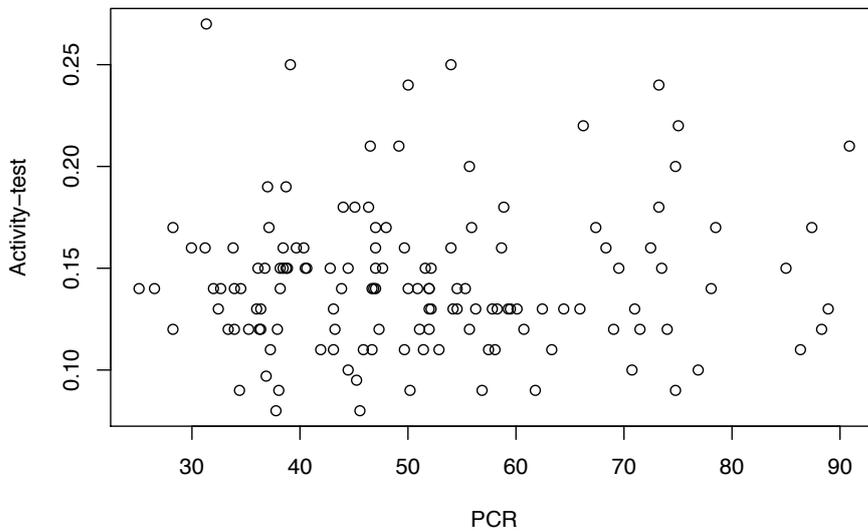


Abbildung 36: DPD-Aktivität in nmol/min/mg Protein vs. PCR CP-Ratio DPD/G6PD

Aus oben angezeigten Streudiagrammen (erstellt von Alain Hamid, Statistiker, Universität Augsburg) läßt sich in allen Vergleichen **keine** Korrelation nachweisen. Ob dieses Ergebnis auf posttranslationale Vorgänge oder auf bestimmte Veränderungen in den Aufarbeitungsverfahren der Proben zurück zu führen ist, kann nicht sicher festgestellt werden.

4. Wissenschaftliche Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert Daten zu den Expressionsniveaus von DPD-mRNA und DPD-Protein sowie DPD-Aktivität, gemessen in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes, von 245 freiwilligen Spendern einer Population der normalen gesunden kaukasischen Bevölkerung. Die Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD) ist das erste und wichtigste Enzym, welches den Abbau von Pyrimidinen zu β -Alanin und Ureidopropionsäure initiiert. DPD gilt als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Abbau der wichtigen Krebsmedikamentengruppe der Fluoropyrimidine, wie zum Beispiel 5-FU und dessen Prodrug Xeloda® ein Capecitabin, sowie Tegafur. Krebspatienten mit reduzierter DPD-Aktivität haben ein hohes Risiko für die Entwicklung einer schweren 5-FU-Toxizität, die manchmal sogar zum Tod des Patienten führt. Der Antimetabolit 5-Fluorouracil, welcher in den 1950er Jahren von Heidelberger erstmals synthetisiert wurde, um die erhöhte Avidität von Tumorzellen für Uracil auszunutzen, übt seine Antitumorwirkung über verschiedene Mechanismen aus. Zu diesen zählen die Hemmung der RNA-Synthese und –Funktion, die Hemmung der Thymidylatsynthase-aktivität und Einbau von 5-FU in DNA, was zu DNA-Strangbrüchen führt ((6) Heidelberger C, *et al.* 1957). Seit seiner offiziellen Markteinführung 02/2001 (Roche) findet Xeloda® als orales Prodrug von 5-FU, neben den üblichen gastrointestinalen Karzinomen sowie Kopf-Hals-Karzinomen ((46) Twelves C, *et al.* 2005, (47) Bang YJ, *et al.* 2012, (48) Noh SH, *et al.* 2014) zunehmend wieder beim Mammakarzinom Verwendung. Hier vor allem in der 2. und 3. Linientherapie, als wichtiger Bestandteil der Therapie. Xeloda® wird aktuell bei 40% aller Triple-negativen frühen Mammakarzinome sowie in Kombination mit Trastuzumab oder Lapatinib auch bei HER2-positiven Tumoren und in der Metastasierung eingesetzt ((49) Geyer CE, *et al.* 2006, (45) Masouda, *et al.* 2017).

In der Create-X-Studie (N Eng J 6/2017) ergab sich erstmals ein deutlicher Effekt im krankheitsfreien Überleben (5 Jahre) und auch im Gesamtüberleben der Patientinnen unter der Gabe von Capecitabinen. Dabei handelte es sich um eine Therapie von Her2-negativen Tumoren, nach durchgeführter neoadjuvanter Chemotherapie mit Anthracyclinen, Taxanen oder beidem und einer non-

pCR (pathologische Complette Remission) nach operativer Therapie.

Die in Japan durchgeführte Multicenter-Studie beinhaltete 910 Patientinnen, die nach operativer Therapie randomisiert entweder Capecitabine (Xeloda®) bekamen oder kein weiteres Medikament in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigten in der Capecitabingruppe 74,1% 5-Jahres-Überleben im Vergleich zu 67,6% in der Kontrollgruppe. Bei triple-negativen Tumoren lag das 5-Jahres-Überleben bei 69,8% im Gegensatz zu 56,1% in der Kontrollgruppe ((45) Masuda N, *et al.* 2017).

Einsatz von Capecitabinen bei Mammakarzinom

Frühes Triple-negatives Mammakarzinom	Nach neoadjuv. CTP (Anthracyclin+Taxan, ggf. +Platin) und OP: Einsatz von Capecitabinen bei non-pCR in der adjuvanten CTP	Masuda N. <i>et al.</i> (2017) NEnglJMed 376:2147-2159
fortgeschrittenes HER2 - Mammakarzinom (beh. mit Anthracyclin+Taxan) in der 1.-3. Therapielinie	Capecitabine, Vinorelbine oder Eribulin als Monotherapie Kombination Capecitabine (Xeloda®) und Bevacizumab (Avastin®)	Phase-III-Studie (Studie 301) Eribulin vs. Capecitabine Studien: (NIS) AVANTI; RIBBON-; CARIN; TURANDOT Miles, D.W. <i>et al.</i> (2013) Ann.Oncol. 24:2773-2780
HER2+ met. Mammakarzinom	Neratinib+Capecitabine vs. Lapatinib+Capecitabine	Phase-III-Studie NALA Saura, C. <i>et al.</i> (2019) J Clin Oncol. 37: Abstr. 1002
Metastasiertes Mammakarzinom	Paclitaxel+Capecitabine	Lück H-J. <i>et al.</i> (2013) Breast Cancer Res. Treat. 139:779-87
Ältere Pat. (>65j) mit frühem Mammakarzinom Stadium I-III	6xCMF vs. 4xAC vs. 6 Zyklen Capecitabine	Muss H.B. <i>et al.</i> (2009) N Engl J Med. 360(20):2055-65

Abbildung 37: Einsatz von Capecitabinen beim Mammakarzinom

Capecitabine (n4-pentyloxycarbonyl-5`-deoxy-5-fluorocytidine; Xeloda®) ist selbst ein Prodrug eines anderen 5-FU-Prodrugs (Doxifluridine) und wurde entwickelt, um wesentliche lokale gastrointestinale Toxizität von Doxifluridine zu minimieren, ohne die Wirksamkeit gegen Tumorzellen zu beeinträchtigen ((20) Lamont EB, *et al.* 1999). Dennoch erleiden unter einer 5-FU-Therapie nach wie vor ca. 9% aller Patienten schwere, teilweise lebensbedrohliche, unerwünschte Wirkungen (WHO Grad III-IV National Cancer Institute). Das Auftreten der starken Nebenwirkungen und der damit stark reduzierten Lebensqualität der betroffenen Patienten ist derzeit mit den vorhandenen klinischen und pharmakoki-

netischen Kriterien leider noch nicht prognostizierbar.

Die Verfügbarkeit des zytotoxischen 5-FU wird in der Absorptionsrate auch sehr stark von der Abbaurate und damit von der Aktivität des initialen genetisch polymorphen Enzyms Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD) bestimmt. Dies ist vielfach in der Literatur nachgewiesen, wie z.Bsp. bei Etienne M.C. *et al.* 1994 (56), der in einer Populationsstudie (185 Krebspatienten) die enge Korrelation der DPD-Aktivität in PBMNC`s mit der 5-FU-Clearance zeigt. Ein DPD-Mangel korreliert eng mit 5-FU-induzierter Toxizität und eine Vielzahl nicht-synonymer Mutations-Varianten wurden bei betroffenen Patienten bereits nachgewiesen ((50) Lazar A. *et al.* 2008).

Auf Grund dieser Kausalität kam es auch zu der aktuellen Empfehlung der EMA (European Medicines Agency) (69) vom 30. April 2020: vor einer geplanten Therapie mit 5-FU, Capecitabinen, Tegafur und Flucytosine die Aktivität bzw. Mutationen von DPD zu testen.

<https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommendations-dpd-testing-prior-treatment-fluorouracil-capecitabine-tegafur-flucytosine>

Diskussion der Methoden und Ergebnisse

Die quantitative Analyse des Enzyms DPD ist wie bereits beschrieben mit verschiedenen Methoden möglich. Ziel dieser Arbeit war es, eine Routinediagnostik zu entwickeln um eine aussagekräftige Quantifizierung des DPD-Enzyms aus dem peripheren Blut zu ermöglichen.

Obwohl die Aktivität von DPD in einer Vielzahl von menschlichen Geweben nachgewiesen werden kann, so findet doch der Großteil der DPD-Aktivität und damit des Katabolismus von 5-FU (90%) in der Leber statt ((62) Dobritzsch D, *et al.* 2001). Lu *et al.* (1993) (54) zeigten, neben anderen, bei zwei Krebspatienten die eine partielle DPD-Inaktivität aufwiesen, dass die verringerte Aktivität der DPD in den peripheren mononukleären Zellen auch mit einer verringerten Aktivität von DPD in der Leber einherging. So wurde impliziert, dass die Aktivität von DPD in PBMNC`s auch als Marker für die allgemeine DPD-Aktivität verwendet werden könnte ((57) van Kuilenburg, *et al.* 1997).

Für die Gewinnung der Blutproben wurde ein Kollektiv von 245 gesunden Probanden unterschiedlichen Alters und Geschlechts (Mitarbeiter der Firma Roche, Penzberg) ausgewählt.

Um den Einfluss des zirkadianen Rhythmus der DPD auszuschließen wurde

das Blut von allen Probanden zwischen 8:00 und 10:00 a.m. abgenommen.

Wie Van Kuilenburg *et al.* (1999) (31) nachwies, zeigte sich die höchste Aktivität von DPD in den frühen Morgenstunden zwischen 1:00 und 3:00 a.m. als Peak sowie im peripheren Blut: in den Monozyten, gefolgt von Lymphozyten und Granulozyten. Die Gewinnung und Lagerung der PBMNC's erfolgte nach einem standardisierten erprobten Verfahren ((54) Lu Z, *et al.* 1993; (55) McMurrugh J, *et al.* 1996, (56) Etienne MC, *et al.* 1994). Wie jedoch Mc Murrough J, *et al.* 1996 (55) beschrieb, ist die Höhe der zu messenden DPD-Aktivität nicht nur durch den zirkadianen Rhythmus sondern auch durch Lagerungsbedingungen beeinflusst. In deren Proben, die in FCS (100% foetal calf serum) oder als dry-Pellet gelagert wurden, fiel die DPD-Aktivität in den ersten 10 Tagen über 50% ab. Stabilste Ergebnisse zeigte die Lagerung der Zellen in 35mM sodium phosphat buffer mit 10% Glycerol, wo der Aktivitätsverlust nur 25-30% war und danach über 40 Tage stabil blieb ((55) McMurrugh J & McLeod HL 1996).

Die Aktivitäts-Messungen unserer Zellpellets in Glycerol fanden jedoch in einem weit längeren Zeitabstand als 40 Tage nach der Aufarbeitung statt (ca. 3-4 Monate), was den etwas niedrigeren Mittelwert von 0,143 nmol/min/mg Protein im Vergleich zur Literatur erklären könnte. McMurrugh *et al.* (1996) (55) zeigte einen Mittelwert von 0,160 nmol/min/mg Protein während Etienne *et al.* (1994) (56) über einen Mittelwert von 222 Einheiten pro mg Protein bei 185 Kopf-Hals-Tumor-Patienten / Frankreich berichtete und Lu *et al.* (1993) (54) berichtete über 189 Einheiten pro mg Protein bei 123 Patienten/USA. Außerdem beschreibt Tateishi T. *et al.* (1996) (53) den wertverändernden Einfluss der Proteinkonzentration im Cytosol auf die gemessene DPD-Aktivität. Er zeigt, dass eine höhere Proteinkonzentration möglicherweise eine geringere DPD-Aktivität aufweist als die gleiche Probe bei niedrigerer Proteinkonzentration.

Unser von DPD-ELISA ermitteltes Frequenzhistogramm für die DPD-Proteingehalte der PBMNC's von 199 Probanden ergab eine Konzentration von 198 +/- 149 ng DPD / mg Protein mit einem Messbereich zwischen 25 und 726 ng DPD / mg Protein.

Das Verteilungsmuster wie es mit ELISA gemessen wurde stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Befunden überein, bei denen ebenfalls die DPD-Enzymaktivität in PBMNC's bestimmt wurde. Die DPD-Enzymaktivität bei z. Bsp. Etienne MC *et al.* (1994) (56) lag im Bereich von > 100-800 pmol/min/mg. Unsere DPD-Aktivität und der mit ELISA bestimmte DPD-Proteingehalt korreliert

ren zwischen $r=0,49$ und $r=0,95$ wie es auch in der Literatur in der Analyse verschiedener Gewebeproben gezeigt wurde ((60) Mori, *et al.* 2000).

Mori *et al.* (2000) (60) untersuchte 241 verschiedene Tumorgewebe auf ihren DPD-Gehalt mit ELISA und Aktivitätstest. Die Messungen zeigten, dass die mit beiden Methoden ermittelten Werte gut miteinander korrelieren, obwohl die mit ELISA gemessenen Werte insgesamt verhältnismäßig niedriger waren.

Im Bezug auf die DPD-mRNA-Expression zeigten unsere Daten bei dem Vergleich der Messergebnisse zum DPD-Proteingehalt mit ELISA (beides gemessen in den PBMNC`s) **keine** Korrelation. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis unter anderen auf posttranslationale Vorgänge zurückzuführen.

Die RT-PCR dient als quantitative Methode der Messung von mRNA bestimmter Biomarker. Damit werden posttranskriptionelle und posttranslationale Regulationen, welche einen Einfluss auf die weitere Proteinaktivität haben können, hierbei nicht erfasst ((73) Porstmann R, Dissertation 2003). Trotzdem zeigte Johnson MR, *et al.* (2000) (61) im Vergleich zum Aktivitätstest bei einer Messung von 18 Darmkrebsproben mit RT-PCR und Aktivitätstest eine signifikante Korrelation ($r=0,903$) zwischen den relativen mRNA Levels und der gemessenen DPD-Aktivität.

Da, laut der damals existierenden Literatur, zunehmend Mutationen im DPD-Gen entdeckt wurden, die mit einer hohen Toxizität bei 5-FU-Therapie einhergingen, wurden 157 Vollblutproben aus unserem Kollektiv an das Klinikum Rechts der Isar zur weiteren Mutationsanalyse gegeben. Die Daten sind in der Dissertation von Seck K. 2006 (74) zusammengefasst. Die in diesem Kollektiv gefundenen 8 verschiedenen Mutationen ergaben in der Zusammenschau mit der Aktivitätsmessung eine Verteilung um den Gesamt-Mittelwert. Keine isolierte Mutation verursachte eine darstellbare Störung der Enzymaktivität; auch bei Betrachtung von Mutationskombinationen (siehe Tab.6 Dissertation Seck K, 2006 (74)) zeigte sich keine deutliche Herabsetzung des Aktivitätswertes an den unteren Referenzbereich von $0,06$ nmol/min/mg Protein, ab welchem It. Johnson MR *et al.* (1997) (30) von einer potentiellen DPD-Insuffizienz gesprochen werden kann. Bisher sind auf der aktuellen Seite des NCBI (National Center for Biotechnology Information) 74 Mutationen auf dem DPD-Gen gelistet. Davon gelten 4 als pathogen: c.2921A>T(p.Asp974Val), c.1905+1G>A, 1-BP

DEL 1897C, 4-BP DEL 296T CAT.

Lazar A. *et al.* (2008) (50) beschreibt 17 Polymorphismen im DPD-Gen, die in Zusammenhang mit 5-FU Toxizität beobachtet wurden. (siehe Tab.1, Artikel Dtsch.Med.Wochenschrift 2008;133;1501-04)

Tab. 1 Nicht-synonyme DPYD-Polymorphismen, die im Rahmen schwerer 5-FU-Toxizität (III-IV) berichtet worden sind.

Polymorphismus	Effekt	Prävalenz	Phänotyp in vivo	in vitro	Kausalität
61C>T	Arg21X	1 Kasuistik	letale 5-FU-Toxizität ¹ [17]	keine Angaben	wahrscheinlich
62G>A ²	Arg21Gln	1 Kasuistik	5-FU-Toxizität [5]	normal [5]	unklar
85T>C	Cys29Arg	19% [3]	unklar, zahlreiche Fälle von 5-FU-Toxizität	unklar [1, 3, 14, 15]	unklar
464T>A	Leu155X	1 Kasuistik	letale 5-FU-Toxizität [8]	keine Angaben	wahrscheinlich
496A>G	Met166Val	8% [3]	unklar, 6 Fälle von 5-FU-Toxizität (1 letal)	unklar [2-4, 15]	unklar
545T>A	Met182Lys	1 Kasuistik	letale 5-FU-Toxizität, partielle Defizienz [2]	keine Angaben	unklar
775A>G	Lys259Glu	1 Kasuistik	5-FU-Toxizität [3]	normal [3]	unklar
1003G>T ²	Val335Leu	sporadisch	5-FU-Toxizität [5]	partielle Defizienz [5]	unklar
1156G>T ²	Glu386X	sporadisch	5-FU-Toxizität [5]	keine Aktivität [5]	wahrscheinlich
1601G>A	Ser534Asn	2% [3]	unklar, mehrere Fälle von 5-FU-Toxizität	unklar [1, 3, 14]	unklar
1627A>G	Ile543Val	14% [3]	unklar, zahlreiche Fälle von 5-FU-Toxizität (teilweise letal)	unklar [1, 14, 15]	unklar
1679T>G	Ile560Ser	1%	3 Fälle von 5-FU-Toxizität [1, 4, 7], partielle Defizienz [4]	partielle Defizienz [1, 4]	wahrscheinlich
IVS14 + 1G>A	Exon-14-Skippping	1%	zahlreiche Fälle von 5-FU-Toxizität (mehrere letal)	keine Aktivität	gesichert
2194G>A	Val732Ile	6-10%	4 Fälle von 5-FU-Toxizität [1, 15]	unklar [1, 15]	unklar
2329G>T	Ala777Ser	sporadisch	2 Fälle letaler 5-FU-Toxizität [2]	partielle Defizienz [2]	unklar
2846A>T	Asp949Val	2% [7]	9 Fälle von 5-FU-Toxizität (2 letal) [2, 7, 15]	partielle Defizienz [14, 15]	wahrscheinlich
2921A>T	Asp974Val	1 Kasuistik	5-FU-Toxizität [13]	keine Angaben	unklar

Legende: ¹Toxizität nur in Verbindung mit der Exon-14-Skippping-Mutation berichtet, ²nicht bei Europäern nachgewiesen; 5-FU = 5-Fluorouracil, Effekt: Änderung der Aminosäuresequenz der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase als Folge des Polymorphismus. X: Vorzeitiger Abbruch der Aminosäuresequenz, verkürztes Protein.

Abbildung 38: Lazar et al. (2008) DPD-Polymorphismen, die im Rahmen schwerer 5-FU-Toxizität berichtet wurden

Del Re et al. (2010) (68) beschreibt 10 Polymorphismen auf dem DPD-Gen, die assoziiert wurden mit einer Fluoropyrimidin-Toxizität.

Polymorphism	Localization
85 T>C	exon 2
464 T>A	exon 5
496A>G	exon 6
1109delTA	exon 10
1601G>A, 1627A>G	exon 13
1896 T>C	exon 14
IVS14+1G>A	splice site variant intron 14
2194G>A	exon 18
2846A>T	exon 22

Abbildung 39: Del Re 2010 - DPD Polymorphismen, die mit Fluoropyrimidin-Toxizität assoziiert sind

Hier eine Übersichtstabelle über die verschiedenen DPD-Testungen der letzten 20 Jahre:

- *Aktivitätstest (aus PBMNC)* → *noch im Einsatz*
 - radioaktiv, Analyse mit HPLC
 - Nachteile: teuer, aufwendig, Schwierig: Probenhandling bzw. Aufarbeitung, die zu Veränderung der DPD-Level führen kann
- *mRNA-Messung mit RT-PCR* → *nicht weiter verfolgt*
 - wegen fehlender Korrelation der intrazellulären DPD-mRNA mit der Enzymaktivität
- *Uracil/5,6-Dihydrouracil-Ratio* → *noch im Einsatz*
 - aus Urin und Plasma
 - HPLC
- *Atemtest: 2-(13)C-Uracil-Metabolismus* → *noch im Einsatz*
 - Messung der Ausatemluft (12)C und (13)C
 - Nachteil: nicht sehr praktikabel, Testsubstrat schwer zu bekommen, Differenzen bei Messungen in verschiedenen Labors
- *Pharmakokinetische Analyse: 5-FU + 5FDHU* → *noch im Einsatz*
 - Zeit-Konzentrationskurve
 - zuverlässiger und weniger anfällig für Variabilität als der Enzymaktivitätstest
 - Nachteil: die Messung kann erst bei der ersten FU-Gabe erfolgen
 - Lösung: ggf. Therapiestart zunächst immer mit reduzierter Dosis
- *Messung von FBAL im Plasma (Endprodukt von 5-FU)*
 - siehe pharmakokinetische Analyse
- *Messung von Gen-Polymorphismen* → *sehr aktuell in Einsatz*
 - lt. NCBI existieren aktuell 67 molekular genetische Tests
 - Verwendeter Test LMU: OMIM-P: 274270; OMIM-G:612779 (DPYD) rs3918290; IVS14+1G>A

Wie im *arznei-telegramm*® (2020) beschrieben lässt sich der DPD-Enzymmangel entweder indirekt (Genotypisierung) oder direkt (Phänotypisierung) durch Messung seiner Funktion bestimmen. Der PRAC (Pharmakovigilanzausschuss) der EMA empfiehlt beide Methoden gleichrangig.

5. Zusammenfassung

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen den aus den drei Messmethoden gewonnenen Daten erstellt werden. Ursächlich dafür können, trotz verwendeter Standards, Fehler in der Aufarbeitung der Proben sein. Außerdem kann es bei diesem großen und sehr variablen Enzym zu Änderungen der Genexpressionen und des dann umgesetzten Enzyms als Proteinstruktur kommen. Daraus resultiert wiederum evtl. eine unterschiedliche Ausprägung der Aktivität bei mittlerweile sehr vielen bekannten Polymorphismen, die teils die Aktivität beeinflussen, größtenteils aber auch nicht. Aus dieser Arbeit und den damit verbundenen Erkenntnissen wurde die rein quantitative Messung der DPD auf mRNA-Ebene mit dem LightCycler® nicht kommerziell weiter entwickelt.

Da die DPD jedoch, wie in der Literatur in den letzten 20 Jahren vielfach beschrieben und analysiert, bis zu 450 (NCBI database of genetic variation, 2001) Polymorphismen aufweist, wovon 54 eine DPD-Defizienz aufweisen, die in 4 Fällen gesichert pathogen und in 24 Fällen teilweise pathogen sind, das heißt eine Toxizität bei 5-FU-Therapie verursachen, hat die Firma Roche Genotypisierungstests für die 9 wichtigsten Mutationen für den LightCycler® entwickelt. Diese Mutationsanalysen können potentielle Werkzeuge zur Untersuchung der 5-FU-Reaktionsfähigkeit darstellen. Die Mutationen können anhand einer Schmelzkurvenanalyse detektiert werden. Das LightCycler® System schafft eine eindeutige Identifizierung, indem es die temperaturabhängige Hybridisierung der sequenzspezifischen Hybridisierungs-Proben mit der Einzelstrang-DNA überwacht und dabei eine einzigartige Schmelzkurvenanalyse durchführt. Denn die Schmelztemperatur hängt nicht nur von der Länge und dem GC-Gehalt des DNA Stranges ab, sondern auch vom Grad der Homologie zwischen den beiden DNA-Strängen. Hybridisierungs-Proben, die an perfekt passende Ziel-DNA gebunden sind, benötigen eine höhere Schmelztemperatur (T_m) zur Trennung als diejenigen, die an DNA gebunden sind, die destabilisierende Fehlpaarungen enthält. Damit ist die Verwendung der Schmelzkurvenanalyse mit HybProbes ein leistungsstarkes Werkzeug zur Genotypisierung von SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) und zur Analyse von Mutationen.

Laut Lazar A. *et al.* (2008) (50) ist klinisch der DPYD-Polymorphismus: IVS14+1 G>A, die sogenannte Exon-14-Skipping-Mutation, am relevantesten. Diese Mutation führt infolge einer veränderten Spleißingstelle zu einer Deletion des Exon14, damit zu einem verkürzten Protein und zum kompletten Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms. Diese Mutation ist mittlerweile in zahlreichen Fallberichten mit lebensbedrohlicher und letaler 5-FU-Toxizität in Verbindung gebracht worden. Etwa 2% der Allgemeinbevölkerung ist Träger dieser Genvariante und etwa 0,2% sind homozygote Träger, d.h. sie besitzen die Variante in beiden Allelen. Dennoch wird bei Betroffenen oft auch von einer heterozygoten Variante in Kombination mit anderen Mutationen berichtet, die ebenfalls schwere Nebenwirkungen erleiden. Bei 136 Patienten trat eine Exon-14-Skipping-Mutation mit schweren 5-FU-bedingten Nebenwirkungen mit einer Prävalenz von 22,8% auf ((63) Ezzeldin H *et al.* 2003; (64) Gross E *et al.* 2003; (66) Morel A *et al.* 2006; (37) Raida M *et al.* 2001; (70) van Kuilenburg AB *et al.* 2002). Gleich häufig nachweisbar ist der 2846A>T-Polymorphismus auf Exon 22, eine Punktmutation die zum Austausch einer Aminosäure führt und mit einer reduzierten DPD-Enzymaktivität assoziiert ist ((66) Morel A *et al.* 2006; (65) Seck K, *et al.* 2005). Ebenfalls sind It. Lazar A. *et al.* (2008) (50) drei vorzeitige Stop-Codons veröffentlicht, die analog zur Auswirkung der Exon-14-Skipping-Mutation zu einem funktionslosen Protein und zu schwerer bis letaler 5-FU-induzierter Toxizität geführt haben ((52) Kouwaki M *et al.* 1998; (67) Morel A *et al.* 2007; (71) van Kuilenburg AB *et al.* 2003). Diese Auffälligkeiten im DPD-Gen, die ausschließlich in Zusammenhang mit letaler 5-FU-Toxizität gefunden wurden, beweisen wiederum die große Bedeutung der DPD-Analyse vor einer geplanten 5-FU-Therapie. Da das DPYD-Gen wie bereits erwähnt sehr viele Polymorphismen aufweist, beeinflussen davon jedoch nur wenige letztendlich die Aktivität des Enzyms. Außerdem unterliegt die DPD neben einem zirkadianen Rhythmus wohl noch weiteren exogenen und endogenen Einflüssen. Unter anderen ist es auch deshalb trotz beträchtlicher Anstrengungen bzgl. der Entwicklung und Validierung von Messmethoden, welche direkt die DPD-Aktivität in vivo (z.B. mit Uracil-Quotienten oder radioaktiv markiertem Uracil) oder ex vivo (in PBMNC's) quantifizieren können ((75) Ploylearmsaeng SA *et al.* 2006) bislang nicht gelungen, einen Test zu etablieren, wodurch die Toxizität akkurat vorhergesagt werden könnte ((50) Lazar A *et al.* 2008).

Del Re *et al.* (2010) (68) hat in ihrem Review einen Algorithmus entwickelt bzw. vorgeschlagen, der zur Testung der DPD-Defizienz vor geplanter Fluoropyrimidintherapie eingesetzt werden könnte. (Abb.40)

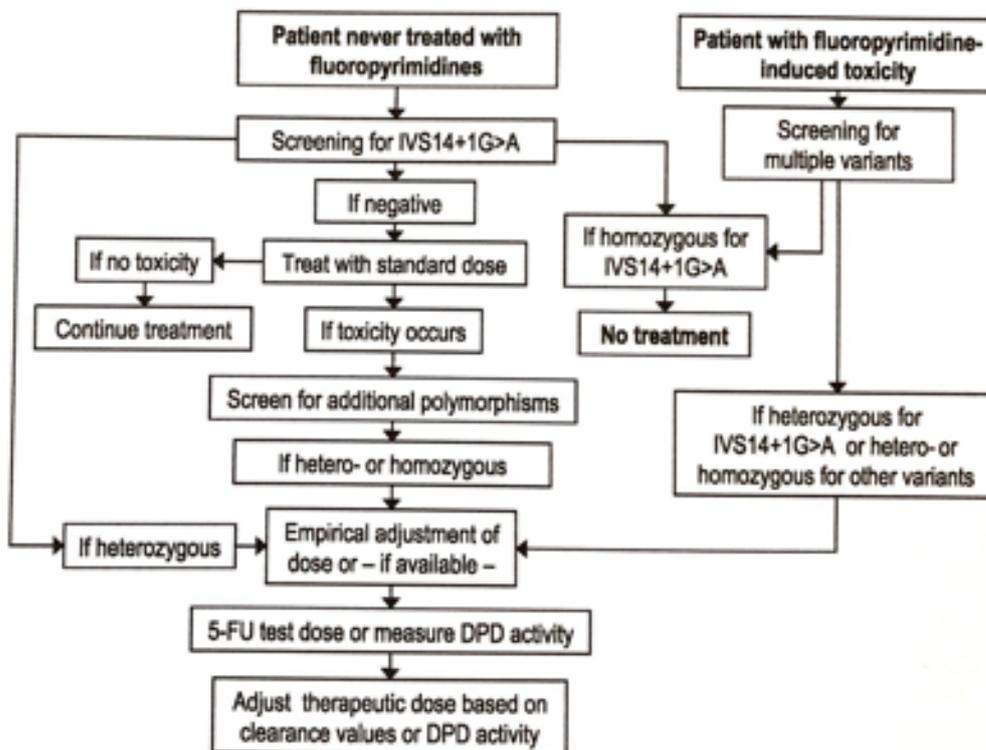


Abbildung 40: Algorithmus zur Testung der DPD-Defizienz vor geplanter Fluoropyrimidintherapie

Demnach ist, wenn eine schwere 5-FU-Unverträglichkeit aufgetreten ist, eine DPYD-Genotypisierung unumstritten indiziert. Wenn sodann im Screening eine homozygote Mutation die zum Exon-14-Skipping führt detektiert wurde, ist eine Therapie mit Fluoropyrimidinen kontraindiziert.

Die EMA (European medicine Agency) (69) hat nun (3/2019) die verfügbaren Daten in Bezug auf die verfügbaren Screening-Methoden zur Feststellung von DPD-Mängeln ausgewertet und bewertet. Daraus erfolgte die allgemeine Empfehlung zur Testung der DPD vor einer geplanten Therapie mit einem Fluoropyrimidin. (30.April 2020, EMA/229267/2020)

Als Schlusswort dieser Arbeit werden nun 2 Beispiele für die Umsetzung dieser Empfehlung der EMA in München aufgeführt:

- Im Brustzentrum der LMU München werden die Patientinnen nun routinemäßig vor Therapie mit 5-FU/Capecitabinen auf DPD-Defizienz (Exon 14-skipping) getestet. Es wird nach Isolation genomischer DNA aus EDTA-Vollblut der Nukleotidaustausch (G>A an Position +1 der konservierten GT-Spleißstelle in Intron 14) mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse (RT-PCR) untersucht. (Prof.Dr.med. D.Teupser)
- Das Labor Becker in München nutzt für den Mutationsnachweis den LightCycler® 480II von Roche. Der Nachweis erfolgt hier ebenfalls mit einer Schmelzkurvenanalyse, bei der die Sonde in dem PCR-Assay spezifisch für die Punktmutation (Intron14) ist und einen höheren Schmelzpeak aufweist, während die Mutation (G>A) einen geringeren Schmelzpunkt hat.

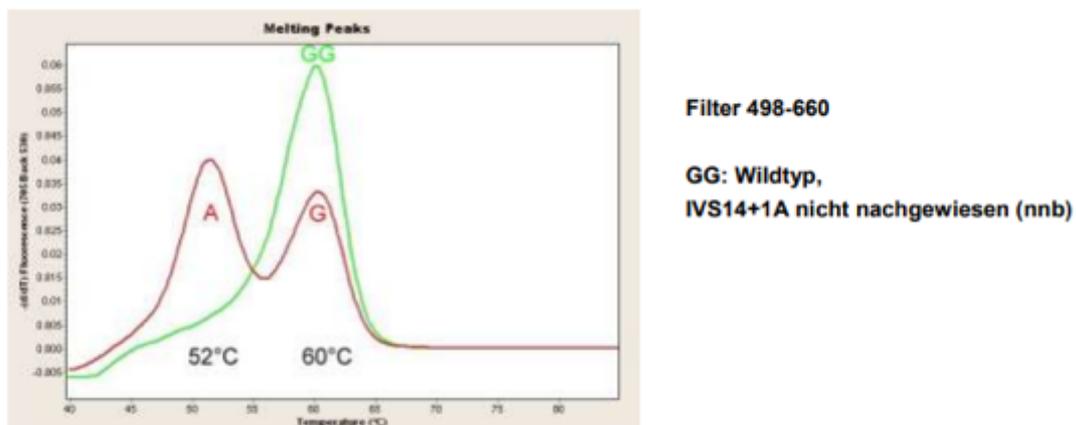


Abbildung 41: Schmelzkurvenanalyse Mutation Exon 14

Die Probenzahl lag hier für das Jahr 2018 bei 3-10 Proben pro Woche. Davon konnten in ca. 3% der Proben die Mutation heterozygot nachgewiesen werden. Keine der Proben war homozygot.

6. Literatur

1. Ervik E, Lam F, Ferlay J et al. (2016) Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2016. <http://goc.iarc.fr/today>
2. Robert Koch-Institut (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?_blob=publikationFile
3. Tumorregister München (TRM) (2017) www.tumorregister-muenchen.de bzw. www.tumorregister-muenchen.de/area.php
4. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert-Koch-Institut (2017) Datenbankabfrage unter www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe1_no_de.html
5. Lokate M, Stellato RK, Veldhuis WB et al. (2013) Age-related changes in mammographic density and breastcancer risk. *Am J Epidemiol* 178: 101-109
6. Heidelberger C, Chaudhuari NK, Danneberg P, et al. (1957) Fluorinated Pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds. *Nature (Lond.)*, 179: 663-666
7. Del Mastro L, et al. (2015) Fluorouracil and dose-dense chemotherapy in adjuvant treatment of patients with early-stage breast cancer: an open-label, 2x2 factorial randomised phase 3 trial. *Lancet* 385, 1863-1872
8. Koscielny S, Tubiana M, Le MG et al. (1984) Breastcancer: Relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 49: 709-715
9. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds); in affiliation with UICC (2009)

10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797): 747-752
11. Clark GM, Dressler LG, Owens MA et al. (1989) Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320: 627-633
12. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ et al. (2012) WHO Classification of Tumors of the breast. Lyon 2012
13. Untch M, Harbeck N, Thomssen Ch et al. (2018/2019) Colloquium Senologie, Relevante Erkenntnisse zur Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit Mammakarzinom
14. Hugh J et al. (2009) Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 27(8): 1168-76
15. Muss H.B., Berry D.A. et al (2009) Adjuvant Chemotherapy in Older Women with Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 360: 2055-2066
16. Moertel CG (1994) Chemotherapy for Colorectal cancer. *N Engl J Med* 330: 1136-1142
17. Hoff P.M., Royce M., Medgyesy D et al. (1999) Oral Fluoropyrimidines. *Sem Onc*, Vol.26 No.6:640-646
18. Zeller WJ. Pyrimidin- und Pyrimidinnukleosid-Analoga. *Allgemeine Tumorthera-*
pie 1996, IV-3, 9:1-16
19. Diasio RB; Harris BE, et.al. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* 1989,16, 215-237

20. Lamont EB, Schilsky RL (1999) The Oral Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1999, Vol.5: 2289-2296
21. Roche Pharma. Xeloda (Capecitabine) Product Monograph. 1998
22. Diasio RB, et al. (1999) Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Resistance to 5-Fluorouracil. *Prog Exp Tum Res* 1999, Vol.36: 115-123
23. Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P, et al. (1995) Diagnostic analysis, clinical importance and molecular basis of DPD-deficiency. *TiPS* 1995, Vol.16: 325-327
24. Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, et al. (1997) Structural Organization of the Human Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Gene. *Cancer Res* 1997, 57:1660-1663
25. Milano G., Etienne MC, Pierrefite V. et al. (1999) DPD deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Can* 1999, 79(3/4):627-630
26. Coenen MJH, et al. (2018) Evolution of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Diagnostic Testing in a Single Center during 8-Year Period of Time. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2018; 90: 1-7
27. Wei X., Elizondo G., Sapone A., et al. (1998) Characterization of the Human DPD-Gene. *Genomics* 1998, 51:391-400
28. Lu Z., Zhang R., Diasio R.B., et al. (1992) Purification and Characterization of DPD from Human Liver. *Jr Bio Chem* 1992, Vol 267: 17102-109
29. Chazal M., Etienne M.C., et al. (1996) Link between Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Liver. *Clin Cancer Res* 1996, Vol 2: 507-510
30. Johnson M.R., Yan J., Shao L., Diasio R.B., et al. (1997) Semi-automated

radioassay for determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity / Screening cancer patients for DPD deficiency, a condition associated with 5-fluorouracil toxicity. *J of Chromatography B*, 1997, 696: 183-191

31. van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NGGM, et al., (1999) Genotype and phenotype in patients with DPD-deficiency. *Hum Genet* 1999, 104: 1-9
32. Milano G, McLeod HL.(2000) Can DPD impact 5-FU-based treatment? *Eur J Cancer* 2000, Vol 36: 37-42
33. Collie-Duguid ESR, Etienne UC, Milano G, et al. (2000) Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 10: 217-223
34. Lu Z., Zhang R., Carpenter J.T., et al. (1998) Decreased DPD-Activity in a Population of Patients with Breast Cancer: Implication for 5-FU-based Chemotherapy. *Clin Can Res* 1998, Vol 4: 325-329
35. Johnson MR, Hageboutros A, Wang K et al. (1999) Life-threatening toxicity in a DPD-deficient patient after treatment with topical 5-FU. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2006-11
36. Barin-Le Guellec Ch, Etienne-Grimaldi MChr, et al. (2019) Toxicities associated with chemotherapy regimens containing a fluoropyrimidine: A real-life evaluation in France. *Europ.J of Cancer* 2019; 124, 37-46
37. Raida M, Schwabe W, Hausler P et al. (2001) Prevalence of a common point mutation in the DPD gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-FU-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2832-9
38. Wigle ThJ, et al. (2019) DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. *Pharmaceutics* 2019; 11,199

39. van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, et al. (1998) The Activity of Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Human Blood Cells. Plenum Press, NY, 1998: 158, 823-826
40. van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ, et al. (2000) Clinical implication of DPD-deficiency in patients with severe 5-FU-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene. Clin Cancer Res 2000; 6: 4705-12
41. Wei X, McLeod HL, McMurrough J et al. (1996) Molecular basis of the human DPD deficiency and 5-FU toxicity. J Clin Invest 1996, 98: 610-615
42. Jacobs BAW, Deenen MJ, Pluim D et al. (2016) Translational research Pronounced between-subject and circadian variability in TS and DPD enzyme activity in human volunteers. Br J Clin Pharm 2016, 82:706-716
43. Variationskoeffizient: Dr. Sven Reese, LMU München; https://www.vetmed.uni-muenchen.de/forschung_promotion/doktoranden/dokumente/reese_doktorandenseminar_teil2.pdf
44. Mattison L.K., Fourie J., Desmond R.A., Diasio R.B., et al. (2006) Increased Prevalence of DPD-Deficiency in African-Americans Compared with Caucasians, Clin Cancer Res 2006;12(18) 9/15
45. Masuda N, et al. (2017) Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy, N Engl J Med 2017; 376:2147-2159
46. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. (2005) Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. N Engl J Med 2005; 352:2696-2704
47. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, et al. (2012) Adjuvant capecitabine and Oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. Lancet 2012; 379:315-321

48. Noh SH, Park SR, Yang HK, et al. (2014) Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:1389-1396
49. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2733-2743
50. Lazar A., Jetter A., et al. (2008) Pharmakogenetik in der Onkologie: 5-Fluorouracil und die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133:1501-1504
51. Van Kuilenburg ABP, van Lenthe H, Blom MJ, et al. (1999) Profound variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human blood cells: major implications for the detection of partly deficient patients. *British J Cancer*, 1999; 79:620-626
52. Kouwaki W, et al. (1998) Identification of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a Japanese patient with 5-Fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2999-3004
53. Tateishi T, Nakura H, Watanabe M, et al. (1996) Preliminary examination of the incubation time or cytosolic protein concentration on DPD activity. *Clinica Chimica Acta* 252 (1996) 1-9
54. Lu Z, Zhang R, Diasio RB et al. (1993) Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Liver: Population Characteristics, Newly Identified Patients, and Clinical Implication in 5-Fluorouracil Chemotherapy. *Cancer Research* 1993; 53, 5433-5438
55. McMurrough J & McLeod HL (1996) Analysis of the dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphism in a British population. *Br J Clin Pharmacol* 1996; Vol 41: 425-427
56. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, et al. (1994) Population Study of

Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Cancer Patients. J Clin Oncol, 1994; Vol12, No11: 2248-2253

57. Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, et al. (1997) Heterozygosity for a Point Mutation in an Invariant Splice Donor Site of DPD and Severe 5-FU Related Toxicity, Europ.J of Cancer, 1997; Vol 33: pp 2258-2264
58. National Cancer Institute. National Cancer Institute Common Toxicity Criteria. <http://www.fda.gov/cder/cancer/toxicityframe.htm>
59. Fleming RA, et al. (1992) Correlation between DPD activity in peripheral blood mononuclear cells and systemic clearance of 5-FU in cancer patients. Cancer Res. 52: 2899-2902
60. Mori K, Hasegawa M, Nishida M, et al. (2000) Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. Int.J. of Oncology, Vol 17: 33-38
61. Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ and Diasio RB (2000) Quantitation of DPD Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry, 278: 175-184
62. Dobritzsch D, Schneider G, et al. (2001) Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. EMBO J., 20: 650-660
63. Ezzeldin H, Johnson MR, et al. (2003) Denaturing high performance liquid chromatography analysis of the DPYD gene in patients with lethal 5-FU toxicity. Clin Cancer Res 2003; 9:3021-3028
64. Gross E, Ullrich T, Seck K, et al. (2003) Detailed analysis of five mutations in DPD detected in cancer patients with 5-FU-related side effects. Hum Mutat 2003; 22: 498

65. Seck K, Riemer S, Kates R, et al. (2005) Analysis of the DPYD gene implicated in 5-FU catabolism in a cohort of Caucasian individuals. Clin Cancer Res 2005; 11: 5886-5892
66. Morel A, Boisdron-Celle M, et al. (2006) Clinical relevance of different DPD gene single nucleotide polymorphism on 5-FU tolerance. Mol Cancer Ther 2006; 5: 2895-2904
67. Morel A, Boisdron-Celle M, et al. (2007) Identification of a novel mutation in the DPD gene in a patient with a lethal outcome following 5-FU administration and the determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. Clin Biochem 2007; 40: 11-17
68. Del Re M, Di Paolo A, et al. (2010) Dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphisms and fluoropyrimidine toxicity: ready for routine clinical application within personalized medicine? EPMA Journal 1:495-502
69. EMA: New testing and treatment recommendations for fluorouracil, capecitabine, tegafur and flucytosine, 13. März 2020; <http://www.a-turl.de/?k=amsd>
70. van Kuilenburg AB, Meinsma R, et al. (2002) High prevalence of the IVS14+1G>A mutation in the DPD gene of patients with severe 5-FU-associated toxicity. Pharmacogenetics 2002; 12: 555-558
71. van Kuilenburg AB, Baars JW, et al. (2003) Lethal 5-FU toxicity associated with a novel mutation in the DPD gene. Ann Oncol 2003; 14: 341-342
72. Dehm B. (2000) Expression und Charakterisierung von humaner Dihydropyrimidin Dehydrogenase und vier ihrer Mutanten. Diplomarbeit im Bereich Biotechnologie, 9/2000 FH Weihenstephan
73. Porstmann R. (2003) Biomarker zur Vorhersage des klinischen Verlaufs von Patientinnen mit Mammakarzinom nach adjuvanter Therapie mit CMF unter besonderer Betrachtung der Enzyme Thymidinphosphorylase, Dihydropyrimidin

Dehydrogenase und Thymidylatsynthase. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der hum. Medizin, Kassel / Marburg 2003

74. Seck K. (2006) Mutationsstudie des Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Gens (DPYD) einer Kontrollpopulation zur Abklärung von DPD-Insuffizienz als genetische Ursache von Fluoropyrimidin-Intoleranz. Versuch der Korrelation von Genotyp und Phänotyp anhand des Vergleichs mit Unverträglichkeit zeigenden Patienten und funktionellen Informationen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der hum. Medizin, Klinikum Rdl der TU-München 3/2006
75. Ploylearmsaeng SA, Fuhr U, Jetter A (2006) How may anticancer chemotherapy with fluorouracil be individualised? Clin Pharmacokinet. 2006; 45(6):567-92

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre, dass ich die an der Ludwig-Maximilians-Universität eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchung zu Expression und Verteilung der Dipyrimidin-Dehydrogenase mittels LightCycler®-PCR, ELISA und Aktivitätstest im Blut von gesunden Probanden – ein Vergleich“

in der Firma Roche in Penzberg zusammen mit dem Universitätsklinikum Rechts der Isar unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel noch nicht erworben habe.

München, 10.10.2021

Silvia Riemer

Teile dieser Dissertation wurden an folgende Publikationsorgane zur Veröffentlichung eingereicht und angenommen:

Seck K, Riemer S, Kates R, et al. (2005) Analysis of the DPYD gene implicated in 5-FU catabolism in a cohort of Caucasian individuals. Clin Cancer Res 2005; 11: 5886-5892

8. Anhang:

Poster (Roche):

- Analysis of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) in peripheral white blood cells of healthy donors using ELISA and quantitative real-time RT-PCR on the LightCycler Instrument and correlation of results.

Freigabe-Dokument Firma Roche, Penzberg 2020

Request # 00027341

Author Information

Select your branch: **PT-Mannheim or PT-Penzberg**

Employee responsible for the content of the submission: **Michael Knoll**

Department: **DQMAP...6164**

Additional Internal (Roche/Genentech) Authors:

External Authors/Collaborators: **Silvia Riemer**

Does this publication include author(s) from a Roche site or Roche Affiliate other than your own? **No**

Please identify Roche site or Roche Affiliate:

All authors have met all of the ICMJE authorship criteria: **Not Applicable**

Publication Information

Document Title: **Untersuchung zu Expression und Verteilung der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase mittels LightCycler®-PCR, ELISA und Aktivitätstest im Blut von gesunden Probanden – ein Vergleich**

Type of Publication: **Academic Thesis**

Abstract Text: **not applicable; for a summary refer to chapter "Zusammenfassung" within the attached document "DPD Dissertation..."**

Target Journal or Forum for Presentation: **Ludwig-Maximilians-Universität München**

Does this proposed publication relate to a previously cleared publication? **No**

List relevant prior Blue Sheet publications (if applicable and desired):

Does this information involve identifiable clinical patient data? **No**

The proposed publication contains the following proprietary information that has not yet been **None**

published:

Is this proprietary information disclosed in a patent or patent application?

No

Please provide additional information:

No patenting is envisaged

Please state reasons:

Statement Patent Department available; see attached file "2020-12-29PatentClearance(Statement.M...)"

Are there any additional facts, such as prior third party commitments through Alliances, Confidential Disclosure Agreements or Material Transfer Agreements, the Patent and Legal Departments should be aware of?

No

RDR #:

1100737

Blue Sheet Request Submission Date:

2020-Jan-28

Decision Date:

2020-Jan-28

Data Sharing

Additional Information

Notes:

Resources

Resource Type	Name	Business Role
Approver	Patrick Bulau	Expert Function
Legal	Olivier Kapp	Legal Approver
Legal	Maria Mertes	Patent Approver
Line Manager	Patrick Bulau	Line Manager
Coordinator	Patrick Bulau	Coordinator

Activities

Activity	Name	Feedback Comments
Line Manager Approval	Patrick Bulau	Approved No responsible "line manager" for this specific request allocateable.
Coordinator Validation	Patrick Bulau	Approved The content of the thesis was discussed with the patent department in advance.
Legal, Patent, Scientific Expert Approval	Patrick Bulau	Approved
Legal, Patent, Scientific Expert Approval	Maria Mertes	Approved
Legal, Patent, Scientific Expert Approval	Olivier Kapp	Approved Genemigt aus sicht von Trademark, doch habe ich die folgenden Kommentare: - Bitte ganzes Dokument auf «LightCycler» ansehen und überall, wo das hochstehende Markenzeichen (®) fehlt, es bitte anfügen. - Gleiches gilt für «XELODA» (z.B. in der Grafik auf Seite 14)

- Gleiches gilt für «MAGNA PURE»
- Bitte am Ende des Dokuments folgende beiden Trademark Statements aufführen:
LIGHTCYCLER, XELODA, MAGNA PURE und CASY sind eingetragene Marken der Roche.
Alle genannten Marken und Produktnamen geniessen Rechtsschutz ihrer jeweiligen Inhaber.

