

Frauenklinik und Poliklinik der
Technischen Universität München des Klinikums rechts der Isar
Direktorin Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle

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.

Katharina Seck

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle
2. Univ.- Prof. Dr. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 08.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.03.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	4
	1. Zytostatische Therapie	4
	2. Fluoropyrimidine – Wirkungsweise und Stoffwechsel.....	5
	3. Das Enzym Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD).....	7
	4. DPD-Defizienz, Genotyp und Phänotyp	8
II.	Zielsetzung dieser Arbeit	10
	1. Allgemeine Zielsetzung.....	10
	2. Etablierung der Methodik: PCR und DHPLC (als Screening-Methode).....	10
	3. Erstellen einer Populationsstudie über DPD Varianten	11
	4. Untersuchung einiger unter Fluoropyrimidin-Toxizität leidender Patienten.....	11
	5. Vergleich der genetischen Daten mit Aktivitätsdaten, Strukturanalyse und Statistik; Versuch der Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp	12
III.	Material und Methoden	13
	1. Blutproben der untersuchten Personen.....	13
	a) 157 zufällig randomisierte gesunde Normalpersonen verschiedenen Alters und Geschlechts, Mitarbeiter der Firma Roche.	13
	b) Vier Patientenblutproben, die während der Chemotherapie mit 5-FU außerreguläre Toxizitätserscheinungen entwickelten und bei denen somit der Verdacht auf DPD-deficiency geäußert worden war.	13
	2. Isolierung genomischer DNA	14
	a) Material	14
	b) Methode.....	15
	3. PCR-Amplifikation der 23 Exons und der dazugehörigen Exon-/ Intronabschnitte	15
	a) Material	15
	b) Methode.....	16
	4. Mutationsanalyse mittels DHPLC	18
	a) Material	18
	b) Methode.....	18
	5. Sequenzierung	21
	a) Material	21
	b) Methode.....	22
	6. Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium.....	24
	7. Aus anderen Untersuchungen verwendete Ergebnisse	24
	a) DPD-Aktivitätsmessung	24
	a) Strukturanalyse der DPD	24
	b) Statistik.....	25
IV.	Ergebnisse	26
	1. Etablierung des Analyseverfahrens und der Methodik zur Detektion von.....	26
	DPD-Varianten.....	26
	a) PCR.....	26
	b) DHPLC.....	27
	2. DPD Mutationen.....	30
	a) Normalbevölkerung	30
	b) Patienten.....	33
	3. Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium.....	36

V. Diskussion.....	38
1. Allgemeine Diskussion.....	38
2. Aktivitätsdaten allgemein.....	39
3. Strukturdaten allgemein	41
4. Statistik: Bootstrap Analyse.....	42
5. Zusammenführung von Genetik, Aktivitätsdaten, Strukturdaten und Statistik.....	43
a) Polymorphismen: 85T>C (Cys29Arg, DPYD*9A) und	43
1627A>G (Ile543Val, DPYD*5)	43
b) 295-298delTCAT (DPYD*7).....	45
c) 496A>G (Met166Val)	45
d) 775A>G (Lys259Glu)	46
e) 1218G>A (Met406Ile), 1236G>A (Glu412Glu).....	48
f) 1601G>A (Ser534Asn, DPYD*4).....	49
g) 1896T>C (Phe632Phe).....	50
h) 2194G>A (Val732Ile, DPYD*6)	50
i) 2846A>T (Asp949Val).....	51
j) 3067C>T (Pro1023Ser)	52
VI. Zusammenfassung.....	53
VII. Literaturverzeichnis.....	55
VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	62
1. Abbildungsverzeichnis	62
2. Tabellenverzeichnis	63
IX. Lebenslauf und Danksagung.....	64

I. Einleitung

1. Zytostatische Therapie

Seit dem ständig steigenden und kontinuierlichen Zuwachs an differenziertem Wissen über zellbiologische und molekularbiologische Zusammenhänge der Karzinogenese und der Karzinominvasion sowie Metastasierung versucht man in der Karzinomtherapie diese Tumorphysiologie kausal zu durchbrechen.

Die Therapieansätze sind konsekutiv sehr mannigfaltig. Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen neben der Fähigkeit zur Metastasierung vor allem durch das ungehemmte invasive Wachstum; Zytostatika hemmen unselektiv das Zellwachstum aller Körperzellen, jedoch wird die relative Selektivität auf das Tumorgewebe durch die hohe Teilungsaktivität der Tumorzellen erreicht. Man unterscheidet die Substanzklassen der Zytostatika aufgrund der verschiedenen Wirkmechanismen: Wirkstoffe, die auf die Phasen des Zellzyklus spezifisch wirken sowie zellzyklusphasen-unabhängige Zytostatika. Zur ersten Gruppe gehören Antimetabolite sowie Mitosehemmstoffe, wobei für die zytostatische Wirkung die Dauer der Therapie entscheidend ist, da die Wirkung nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus eintritt. Bei phasen-unspezifischen Zytostatika wie z. B. Alkylantien, Platinverbindungen und zytostatischen Antibiotika, die in allen Phasen des Zellzyklus wirksam sind, ist der entscheidende Parameter zur erfolgreichen Therapie die Konzentration des Wirkstoffes.

Ein weiterer Ansatz zur relativ spezifizierten Tumorthherapie ist der Einsatz von hormonellen Wirkstoffen. Ansatzpunkt dieser Therapeutika ist die Hormonrezeptorexpression einiger Tumorarten wie Mamma- oder Prostatakarzinom und folglich die Wachstumshemmung durch Blockade der Hormonrezeptoren.

Neueste Studien zeigen eine äußerst wirksame Therapie mit Stoffen, die mit Rezeptoren interagieren, die Tumorzellen an ihrer Oberfläche exprimieren: Herceptin bei Her-2-neu exprimierendem Mamma-Karzinom.

2. Fluoropyrimidine – Wirkungsweise und Stoffwechsel

Die Substanzklasse der so genannten Antimetabolite ist aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Nukleinsäure-Bestandteilen in der Lage, mit der Neusynthese der Tumorzellen und respektive aller Zellen zu interferieren. Durch die Präsentation von strukturanalogen Pyrimidinen und Purinen sowie aufgrund des Angebots der daraus gebildeten Nucleoside können essentielle Synthesebausteine nicht mehr ausreichend synthetisiert werden und sind zusätzlich qualitativ verändert, so dass die Funktion der aus diesen Substraten entstandenen Nukleinsäuren beeinträchtigt oder blockiert ist. Ein spezifischer Eingriff in die Syntheseleistung von Tumorzellen stellt die Verabreichung von Substrat-Analoga dar, deren wichtigster und bekanntester Vertreter Fluorouracil, ein Pyrimidin-Analagon ist. Durch 5-Fluorouracil wird die Thymidin-Synthese beeinflusst, da die bei der Umwandlung der Vorstufe von Uracil, **Desoxyuridin-monophosphat (dUMP)** in Thymidin reagierende 5-Position blockiert ist. Die Ähnlichkeit der van-der-Waalschen Radien der Substituenten H und F ermöglicht die Umwandlung des in Position 5 modifizierten Substrates in **5-Fluorouridin-monophosphat (F-UMP)** und die darauf folgende Phosphorylierung zum Diphosphat (F-UDP). Das daraus gebildete 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-diphosphat wird schließlich durch Phosphat-Abspaltung in das zytotoxische 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-monophosphat (F-dUMP) überführt.

Im aktiven Zentrum der Thymidilat-Synthase kann das zu dUMP analoge F-dUMP als Substrat zusammen mit dem Cofaktor N⁵,N¹⁰-Methylen tetrahydrofolat gebunden werden und nimmt am ersten Teilschritt der C1-Übertragung teil, wobei eine kovalente Fixierung des falschen Substrates erfolgt. Jedoch kann durch Blockierung der Position 5 die Thymidilat-Synthase das Substrat nicht umsetzen, so dass deren Funktion eingeschränkt ist, was noch durch die Tatsache verstärkt wird, dass die Bindungsaffinität des Fluor-substituierten Substrates F-dUMP zum Enzym vielfach höher ist als die des ursprünglichen dUMP. Auf diese Weise wird die Methylierung von Desoxyuridylsäure zu Desoxythymidylsäure unterbrochen und die DNA-Replikation der Zellen inhibiert. Die Bildung dieses ternären Komplexes erklärt, warum die Gabe von Folinsäure die Wirkung von 5-FU noch steigern kann. Diese Wirkung des Fluorouracils ist Zellzyklus-spezifisch für die S-Phase der Zellteilung.

Weiterhin wird F-UTP als „falsches“ Nukleotid in RNA und weiterhin F-dUTP in DNA eingebaut, was zytotoxische Effekte nach sich zieht.

Ähnlich wirkende Substrat-Analoga sind Cytarabin und Gemcitabin. Eine Neuerung in dieser Substanzklasse stellt Capecitabin (Xeloda®) dar, ein oral verfügbares Fluoropyrimidin, das aufgrund hoher intratumoraler Thymidinphosphorylase-Konzentrationen hauptsächlich im Tumor in 5-FU umgewandelt wird und somit eine Reduzierung systemischer Wirkungen bewirkt (Scheithauer et al, 2003).

Verwendung findet das klassische 5-FU als eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika in der Therapie solider Tumoren: Karzinome des Gastrointestinaltraktes werden additiv und adjuvant hauptsächlich im Rahmen des Venezia-Schemas mit der Kombination 5-FU und Folinsäure therapiert. Bei der Behandlung des Mamma-Karzinoms wird 5-FU in Kombination mit anderen Substanzen innerhalb eines Therapieregimes verwendet: mit Cyclophosphamid und Methotrexat (CMF), Cyclophosphamid und Epirubicin (FEC) oder Cyclophosphamid und Adriamycin (FAC).

Beim fortgeschrittenen metastasierten Mamma-Karzinom mit Anthrazyklin- und Taxanresistenz konnte Capecitabin eine Ansprechrate von über 20% und eine mediane Überlebenszeit von 12 Monaten erzielen (Blum et al, 2001).

Die therapeutische Wirksamkeit des 5-FU wird hauptsächlich durch sein pharmakokinetisches Profil bestimmt (Heggie et al, 1987): die Verfügbarkeit von 5-FU für den anabolen Stoffwechsel und die daraus resultierenden zytotoxischen Effekte wird durch das ratenlimitierende Enzym des Pyrimidinkatabolismus, die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD), bestimmt, das 85% des Antimetaboliten sofort in inaktive Kataboliten umwandelt (Abb. 1). Ein weiterer Bestandteil von 5-FU wird direkt über die Nieren ausgeschieden, so dass lediglich ein geringer Prozentsatz von annähernd 3% der applizierten Dosis für therapeutische Effekte utilisierbar ist.

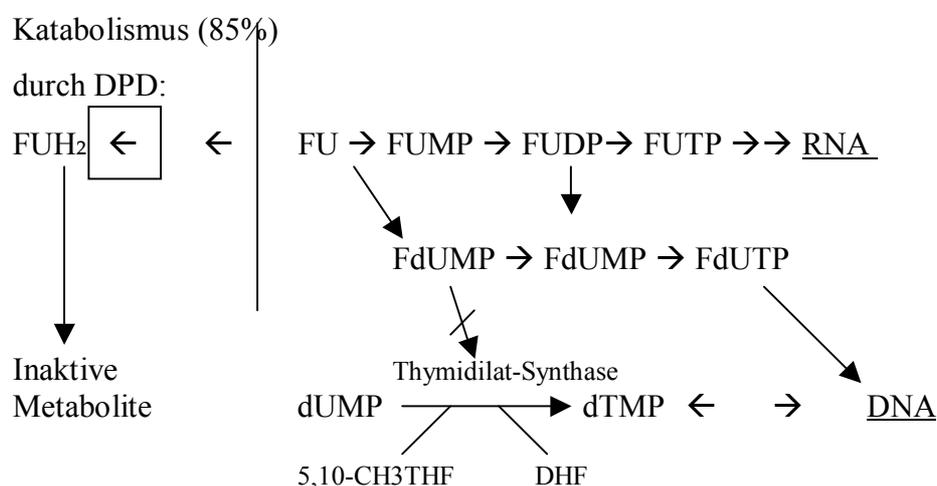


Abbildung 1: Stoffwechsel-Weg der Fluoropyrimidine

3. Das Enzym Dihydropyrimidinhydrogenase (DPD)

Das Enzym DPD wird durch das Gen DPYD kodiert, das erstmalig von Yokota et al, 1994, charakterisiert worden war. Dieses ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1p22 lokalisiert und besteht aus 23 Exons und den dazugehörigen Intronabschnitten, die sich über 150 kb auf der genomischen DNA verteilen (Abb. 2). Das native DPD-Protein enthält 1025 Aminosäuren.

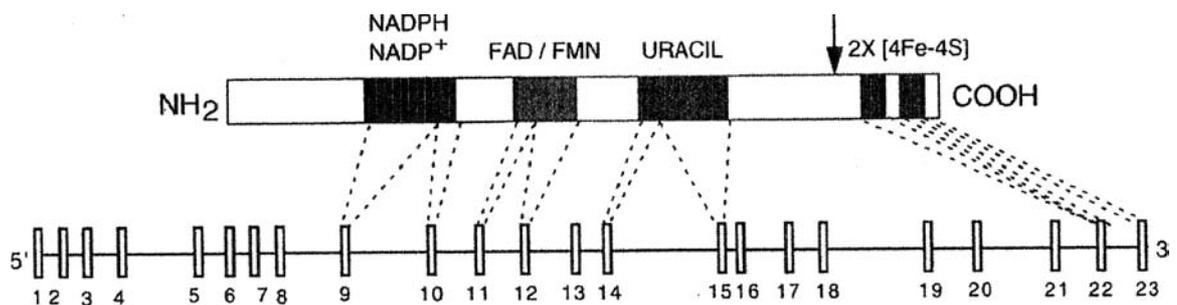


Abbildung 2: Gen-Struktur der DPYD-Gens

Die Struktur der Exons zeigt eine Organisation in verschiedene Domänen, die Bindungsstellen für das Substrat Uracil und Thymin sowie die Kofaktoren wie NADPH, Flavinmononukleotid und Flavindinukleotid bilden (Abb. 3). Des Weiteren lassen sich vier für den Elektronentransfer nötige Eisen-Schwefel-Cluster in der Struktur des Enzyms nachweisen, deren Störung oder Neuorganisation bei potentiellen DPD-Mutationen Funktionseinschränkungen bewirken können (Dobritzsch et al, 2002).

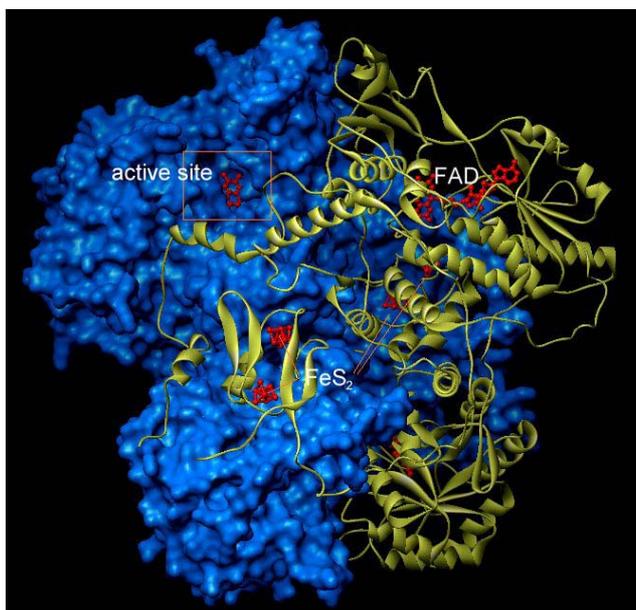


Abbildung 3: 3-D Struktur der Dihydropyrimidinhydrogenase

Diese Aminosäurepositionen, die an wichtigen Interaktionen mit Kofaktoren, dem Substrat oder dem Elektronentransfer beteiligt sind, zeigen eine hohe Konservierungsrate im Laufe der Evolution (Mattison et al, 2002). Im Vergleich des isolierten Proteins des Schweins zeigt sich eine Homologie mit der humanen DPD von 93%, unter allen Säugern besteht eine zu 94-96% identische Sequenz. Die cDNA-Sequenzen von Intervertebraten wie z.B. Drosophila und C.elegans zeigen noch eine Homologie zur humanen cDNA von 93% bzw. 79%. Aus dieser hohen Konservierungsrate lassen sich durch Vergleich der konservierten Bereiche Rückschlüsse auf die funktionell essentiellen Abschnitte der DPD ziehen und helfen bei der Einteilung von DPYD-Alterationen in Polymorphismen und funktionsbeeinträchtigende Mutationen.

4. DPD-Defizienz, Genotyp und Phänotyp

Seit dem Beginn der Analyse der DPD Sequenz lassen sich ständig neue Alterationen nachweisen. Jedoch nur wenige dieser Varianten lassen sich bisher mit Einschränkungen der DPD-Funktion korrelieren.

Zum Beispiel resultiert aus der Mutation IVS14+1 g>a (DPYD*2A) der Verlust des Exons 14; diese so genannte Exon 14-Splice-Mutation bewirkt deshalb den Funktionsverlust des Enzyms DPD. Ebenso lässt die Deletion im Exon 4 (295-298delTCAT, DPYD*7) sicher davon ausgehen, dass das Enzym nicht mehr funktionsfähig kodiert wird, da sich das Leseraster verschiebt und somit ein verändertes funktionsloses Enzym entsteht.

Interindividuell lassen sich Schwankungsbreiten der Enzymaktivität nachweisen, die jedoch keine pathologische Konsequenz nach sich ziehen. Zusätzlich lässt sich eine zirkadiane Rhythmik der Dihydropyrimidindehydrogenase feststellen, die ebenfalls keine Störung in der Clearance der zu metabolisierenden Substanzen bewirkt (Lu et al, 1993).

Die homozygote DPD-Defizienz ist bisher phänotypisch ohne Exposition mit Fluoropyrimidinen nur in der Pädiatrie bekannt: das Krankheitsbild der Stoffwechselkrankheit Thyminuracilurie, deren Träger einen kompletten Mangel der DPD vorweisen. Klinisch zeigen sich mentale und motorische Retardierung, Epilepsie und hohe Konzentrationen von Uracil und Thymin im Urin (van Kuilenburg et al, 1999). Diese Personengruppe ist per se absolut kontraindiziert für eine Therapie mit Fluoropyrimidinen, lässt sich aber ohnehin klinisch leicht identifizieren.

Bei Patienten, die erst unter einer Chemotherapie mit Fluoropyrimidinen eine Unverträglichkeit entwickeln, liegt jedoch meist nur eine partielle DPD-Insuffizienz vor, so dass entweder nur ein Allel von der Alteration betroffen ist oder die Mutation die Enzymfunktion nicht vollständig inhibiert. Jedoch können unter der Chemotherapie schwerwiegendste Nebenwirkungen auftreten, die das normale tolerable Maß überschreiten. So wird von Patienten berichtet, die an schwersten Toxizitäten Grad 3-4 nach den Kriterien der World Health Organization (WHO) litten und deren Mortalität infolgedessen sehr hoch ist. Symptome sind vor allem neurologischer und hämatologischer Art, die neben den bekannten Nebenwirkungen der Alopezie, des Hand-Fuß-Syndroms, der Nausea zusätzlich auftreten (Johnson et al, 1999; Raida et al, 2001; Takimoto et al, 1996; Van Kuilenburg et al, 2000).

Der Benefit dieser betroffenen Patienten durch die begonnene Chemotherapie ist sehr gering, da die Therapie aufgrund der Toxizität aus vitaler Indikation abgebrochen werden muss und erst nach oft langwieriger Erholung mit einer alternativen Chemotherapie begonnen werden kann.

Es stellt sich daher die dringende Frage, wie man prätherapeutisch dieses Patientenkollektiv identifizieren kann, um eine individuell effektive Therapie einleiten und eine 5-FU-Toxizität vermeiden zu können.

Bisher konnte nur bei einigen Mutationen im DPYD-Gen die Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp, d.h. dem Träger einer Fluoropyrimidin-Toxizität verursachenden Mutation hergestellt werden. Ebenso fehlte die Möglichkeit eines effektiven und schnellen Screenings der potentiellen Träger einer Mutation, die eine DPD-Insuffizienz verursacht. Patienten, die Träger zum Beispiel der Exon 14-Splice – Mutation oder der Exon 4-Deletion-Mutation sind, sollten deshalb ebenso wie Patienten mit anderen funktionsbeeinträchtigenden Mutationen vor Einleiten einer Chemotherapie mit 5-FU identifiziert werden.

II. Zielsetzung dieser Arbeit

1. Allgemeine Zielsetzung

Um einen Zusammenhang zwischen möglichen Ursachen der beschriebenen DPD-Insuffizienz und konsekutiver 5-FU-Intoleranz zu gewinnen, muss zunächst ein Kollektiv an Normalpersonen untersucht werden. Diese Population sollte auf dessen genetische Struktur analysiert werden, um für Vergleiche mit Patienten eine Grundlage geschaffen zu haben.

Zunächst sollten die methodischen Grundlagen zur Untersuchung ausgearbeitet werden: man brauchte zuverlässige Methoden, die sowohl ein großes Kollektiv bewältigen können als auch in der Sensitivität und Spezifität exakt sind.

Im weiteren Schritt sollten anhand der Mutationsverteilung in der Normalbevölkerung erste Rückschlüsse auf die Wertigkeit der Alterationen gezogen werden, um dann im folgenden Vergleiche mit den genetischen Profilen von Patienten anzustellen.

Schließlich war das Ziel, die in der Mutationsanalyse erhaltenen Daten mit weiteren Untersuchungen aufzuarbeiten: die genetischen Daten wurden mit Ergebnissen von DPD-Aktivitätstests, Strukturdaten und Statistik in Korrelation gesetzt.

2. Etablierung der Methodik: PCR und DHPLC (als Screening-Methode)

Es musste zunächst nach der Gewinnung der DNA aus den Zellen der peripheren mononukleären Systems (PBM-Zellen) diese mittels PCR (polymerase chain reaction) vervielfältigt werden. Das Gen der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPYD-Gen) besteht aus 23 Exons mit den angrenzenden Intronabschnitten, die einzeln mit dazugehörigen Primern und unterschiedlichen PCR-Protokollen analysiert werden mussten. Die aus der Literatur beschriebenen Primer wurden hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit überprüft; da jedoch einige derer kein oder ein ungenügendes PCR-Produkt hervorbrachten, sollten die Primer dieser Exons neu entworfen werden. Schließlich musste ein PCR-Protokoll entworfen werden, das ein optimales PCR-Produkt produziert.

Zur Mutationsanalyse musste die Methode der DHPLC etabliert werden: für jedes Exon sollte das optimale Programm und die exakten Analysebedingungen gefunden werden; des Weiteren sollten Exons, die aufgrund ihrer Länge mehrere Fragmente

beinhalten, in der Analyse weiter differenzierbar sein, um keine Mutation zu übersehen.

Ziel dieser exakten Aufarbeitung war, eine spezifische und sensitive Methodik zu entwickeln, die alle Mutationen sichtbar macht und eine direkte Sequenzierung ersetzen kann.

3. Erstellen einer Populationsstudie über DPD Varianten

Es wurden 157 gesunde Personen (Mitarbeiter der Firma Roche) unterschiedlichen Alters und Geschlechts in die Populationsstudie aufgenommen. Von diesen Individuen sollte aus dem entnommenen Blut DNA extrahiert und die 23 Exons und die dazugehörigen Exon-/ Intronabschnitte des DPYD-Gens mittels PCR amplifiziert werden. Im Anschluss daran konnte jedes Exon und die flankierenden Intronsequenzen mithilfe der DHPLC hinsichtlich Referenz-Sequenz oder aberranter Sequenz analysiert werden.

Ziel war es, erstmalig eine vollständige Analyse des gesamten DPYD-Gens von jeder der zu testenden Person zu erhalten, um im weiteren Schritt Aussagen über die Verteilung der DPD-Varianten in der Normalbevölkerung treffen zu können.

Weiterhin sollten neue Mutationen oder Alterationen entdeckt werden, die möglicherweise eine DPD-Insuffizienz bewirken können, und ebenfalls deren Häufigkeit determiniert werden.

Anhand der Häufigkeiten der Varianten sollte ein erster Hinweis auf die Unterscheidung in Polymorphismen und funktionsbeeinträchtigende Mutationen erhalten werden, um dann in weiteren Untersuchungen genauere Unterscheidungen treffen zu können.

4. Untersuchung einiger unter Fluoropyrimidin-Toxizität leidender Patienten

Zusätzlich zur Analyse der gesunden Normalpopulation sollten einige Patienten untersucht werden, die klinisch unter Fluoropyrimidin-Unverträglichkeit litten. Die Ergebnisse von diesen Individuen sollten dazu beitragen, eine Einteilung der Mutationen vornehmen und weiteren Einblick in das Krankheitsbild DPD-Insuffizienz gewähren zu können.

5. Vergleich der genetischen Daten mit Aktivitätsdaten, Strukturanalyse und Statistik; Versuch der Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp

Die alleinige Betrachtung der genetischen Daten der Populationsstudie lässt noch keinen Rückschluss auf weitere Fragen zu; es bleibt weiterhin die Frage der definitiven Zuordnung zu Polymorphismen oder zu das Enzym in seiner Funktion beeinträchtigende Mutationen offen, da die Häufigkeitsverteilung der Varianten in der Normalbevölkerung lediglich in der weiteren Argumentation unterstützend mit heran gezogen werden kann.

Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe von funktionellen Daten eine weitere Bewertung der Varianten vorzunehmen. Für diesen Zweck sollten zunächst die genetischen Daten eines jeden Probanden mit der individuellen Enzymaktivität in Korrelation gesetzt werden. Im weiteren Schritt sollten diese erhaltenen Ergebnisse mit Daten aus der Analyse der dreidimensionalen Proteinstruktur in Einklang gebracht werden. Schließlich sollte zur abschließenden Bewertung der Ergebnisse aus Mutationsanalyse, DPD-Aktivitätsdaten und Strukturanalyse die gewonnenen Daten statistisch überprüft und belegt werden.

III. Material und Methoden

1. Blutproben der untersuchten Personen

a) 157 zufällig randomisierte gesunde Normalpersonen verschiedenen Alters und Geschlechts, Mitarbeiter der Firma Roche.

b) Vier Patientenblutproben, die während der Chemotherapie mit 5-FU außerreguläre Toxizitätserscheinungen entwickelten und bei denen somit der Verdacht auf DPD-deficiency geäußert worden war.

Patientin 1 war wegen eines invasiv duktales Mamma-Karzinoms nach Mastektomie und Axilladisektion adjuvant zunächst mit drei Zyklen Epirubicin, gefolgt von einer einmaligen Gabe Taxol und schließlich mit einem Doppelyklus CMF behandelt worden. Unter dem zweiten Zyklus mit CMF (Cyclophosphamid 600mg/m², Methotrexat 40mg/m², 5-FU 600mg/m²) reagierte sie mit einer starken ubiquitären Mukositis (WHO Grad III) und stark reduziertem Allgemeinzustand sowie Leukopenie von 1,9 G/l und Neurotoxizität (jeweils WHO Grad II). Nach Beendigung dieses Zyklus und Abbrechen der Therapie besserten sich die Beschwerden.

Patientin 2: Diese Patientin, die bei einem nodalpositiven Mamma-Karzinom mit dem CMF-Schema behandelt worden war, reagierte drei Wochen nach Beginn des ersten Zyklus mit febriler Leukopenie (0,87 G/l) (WHO Grad III), Thrombozytopenie (88 G/l), Mukositis (WHO Grad III) und starker Verschlechterung des Allgemeinzustandes.

Patientin 3 hatte wegen eines Rektum-Karzinoms nach tiefer anteriorer Rektumresektion 5-FU als Dauerinfusion nach dem Mayo-Protokoll (5-FU 425mg/m², Folsäure 20mg/m²) erhalten. Sie reagierte mit verstärkter Toxizität (Mukositis, Leukopenie und Enterotoxizität, jeweils WHO Grad II-III), so dass die Chemotherapie unterbrochen werden musste.

Patientin 4: Diese Patientin erhielt adjuvante Chemotherapie ebenfalls nach dem Mayo-Protokoll wegen eines nodalpositiven Kolonkarzinoms. Sie entwickelte nach

dem ersten Zyklus Mukositis und Enterotoxizitätserscheinungen (jeweils WHO Grad III), so dass die Therapie nicht fortgeführt werden konnte.

Die schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem getesteten Probanden und Patienten eingeholt.

2. Isolierung genomischer DNA

a) Material

- 10ml EDTA-Blut pro Proband / Patient
- Lyse Puffer pH 7,5 (Lagerung bei 4°C)
 - o 320mM Saccharose 109,44g
 - o 5M MgCl₂ x 6H₂O 1,01g
 - o 10mM Tris HCl 1,21g
 - o 1% TX-100 (Triton) 10ml
 - o Aqua bidest add 1l
- SE-Puffer pH 8,0
 - o 75mM NaCl 4,39g
 - o 1mM EDTA 8,41g
 - o Aqua bidest add 1l
- TE-Puffer pH 8,0
 - o 10mM Tris HCl 1ml
 - o 1mM EDTA 0,2ml
 - o Aqua bidest add 100ml
- 20% SDS
 - o SDS 20g
 - o Aqua bidest add 100ml
- 6M NaCl
 - o NaCl 35,0g
 - o Aqua bidest add 100ml
- EDTA 0,5mM pH 8,0
 - o EDTA 9,3g
 - o Aqua dest add 50ml
- Ethanol 70%, Isopropanol
- Proteinase K (10mg/ml)
- EDTA-Röhrchen
- Falcon Tubes (50ml)
- Glashäkchen

b) Methode

10ml EDTA-Blut werden mit der dreifachen Menge Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und bis zur vollständigen Lysierung auf Eis gestellt; nach anschließender Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4°C) wird der Überstand, in dem sich die zellkernlosen Erythrozyten befinden, verworfen. Das Sediment mit den zellkernhaltigen Leukozyten wird wiederum in 10ml Lysepuffer resuspendiert, auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet mit 5ml SE-Puffer, 250µl 20% SDS und 25µl Proteinase K versetzt und über Nacht im Wasserschüttelbad bei 37°C inkubiert. Der SE-Puffer lysiert die DNA-haltigen Leukozyten, um deren DNA zu gewinnen, SDS löst die Membranen auf und durch Proteinase K wird die erhaltene DNA von Proteinen gelöst.

Nach dieser Proteolyse werden in jede Probe zur Proteinfällung 1,4 ml NaCl (6M) zugegeben; dies wird nach intensivem Mischen im Vortex-Gerät erneut zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, Raumtemperatur). Zum DNA-haltigen Überstand wird je 10 ml Isopropanol zugefügt, so dass die DNA ausfällt; die so als „Faden“ sichtbare DNA wird zum Waschen in 70% Ethanol aufgenommen und anschließend an der Luft getrocknet. Schließlich wird das getrocknete DNA-Knäuel je nach Menge in ungefähr 300µl TE-Puffer gegeben, um darin gelöst zu werden.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird nach 10 Tagen nach Lagerung bei 4°C eine photometrische Messung der Extinktion im Verhältnis 260/280 nm durchgeführt; daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit des PCR-Produktes ziehen.

Die Proben werden bei -20°C aufbewahrt.

3. PCR-Amplifikation der 23 Exons und der dazugehörigen Exon- / Intronabschnitte

a) Material

PCR-Ansatz (Expand High Fidelity PCR System, Roche, Mannheim)

- mit TE-Puffer auf 10ng/µl verdünnte genomische DNA 5µl
- Puffer mit MgCl₂ (1,5 oder 2mM MgCl₂) 5µl
- dNTP-Mix 2mM 2,5µl
- Primer forward 2µM 5µl

- Primer reverse 2 μ M 5 μ l
- Polymerase 3,5U 0,3 μ l
- H₂O add 50 μ l

Gerät: MJ Research PTC 200 Thermocycler, Biozym, Hess. Oldendorf

b) Methode

Bei der Standard- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki et al, 1989, wird ein bestimmtes DNA-Fragment durch zugefügte synthetische Oligonukleotidprimer in vitro amplifiziert, um für nachfolgende Analytik eine ausreichende Menge des ausgewählten DNA-Fragments zu erhalten.

Die PCR gliedert sich grundsätzlich in drei Abschnitte, die mehrmals wiederholt werden. Zu Beginn wird die Doppelstrangstruktur der DNA bei 94°C denaturiert, es folgt die Anlagerung (annealing) der Primer an die Einzelstränge, wobei die genaue Temperatur von den jeweiligen Primern bestimmt wird. Anschließend erfolgt mittels des Enzyms Taq-Polymerase die Elongation bei 72°C, die Einzelstränge werden zu Doppelsträngen zusammengelagert. Dieser gesamte Zyklus, bei dem sich jeweils das Ausgangsmaterial verdoppelt, wird 32-mal wiederholt.

Im vorliegenden Fall wurden größtenteils die Primerpaare verwendet, so wie sie von van Kuilenberg et al, 2000 veröffentlicht worden waren. Die Primersets für Exon 3 und Exon 8 wurden neu erstellt mithilfe des Programms auf folgender Website: http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. Die zugrunde liegende genomische Sequenz ist unter der Zugangsnummer NT021979 der NCBI erhältlich. Für das Exon 18 wurde von J. Fischer (Transgenomic, Inc., San Jose, USA) ein Primerpaar ausgearbeitet.

Die Länge der DPYD Fragmente reicht von 184 bis 453 Basenpaaren, die sich vor allem für die DHPLC-Analyse als optimal erwiesen hat.

Die Sequenzen und die Länge der verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 1 dargestellt:

Exon	bp	Primer for (5')	Primer rev (3')
1	184	gctgtcacttggctctct	cacctaccgcagagca
2	285	gtgacaaagtgagagaccgtgtc	gccttacaatgtgtggagtgagg
3	330	caattttaatgaatgctacceaat	ctgaatggaggcaatgaact
4	245	ggtagaaaatagattatctc	gatttgctaagacaagctg
5	284	gtttgtcgtaatggctg	atttgtgcatgggatgg
6	357	gaggatgtaagctagtctc	ccatttgtgtgctggaagtc
7	360	gtcctcatgcatatcttgtgtg	gcttctgctgatgtagc
8	324	tttggctgacttttcattc	tggccaatcatttctatctg
9	242	ccctcctcctgctaag	gaacaatgtgctgctgag
10	342	gagagtgcacttcatcctgg	ctgttgggtgacaactcc
11	442	actggtaactgaaactcag	caattccctgaaagctag
12	453	ttccctgtatgtgaggtga	gaaagcacttatccattgg
13	440	cggatgactgtgtgaagtg	tgtgtaatgataggctgtgc
14	410	tgcaaaaatgtgagaaggacc	cagcaaagcaactggcagattc
15	358	tatctttgtgtacaactgga	tgtgaaatccaaggacc
16	223	aacggtgaaagcctattgg	tagtaactatccatacggggg
17	238	cacgtctccagcttggctgtg	cgggcaactgattcaagtcaag
18	220	ttgaatgggttttaactatcgtgtctt	aagaaagcacaatgcaag
19	300	gtccagtgacgctgtcatcac	cattgcattgtgagatggag
20	399	tctcttggttgacactgg	cacagacctatcatatggctg
21	228	tctgacctaacatgcttc	ccagtaaagtaggcatac
22	291	gagcttgctaagtaattcagtggc	agagcaatatgtggcacc
23	269	ggggacaatgatgacctatgtgg	ggtgacatgaaagttcacagcaac

Tabelle 1: Primerpaare der 23 Exons und Länge der Exons in Basenpaaren

Das exakte PCR-Programm ist in folgender Tabelle 2 dargestellt:

Step	Temp	Time
1	94°C	5 min
2	94°C	30 s
3	*	30 s
4	72°C	1 min
5	go to 2	32 cycles
6	72°C	8 min
7	4°C	forever
8	end	

* Temperatur vom jeweiligen Primer des Exons abhängig

Tabelle 2: PCR-Programm

4. Mutationsanalyse mittels DHPLC

a) Material

- 5µl in TE-Puffer gelöste DNA
- Puffer A: 0,1M TEAA pH 7,0
 - o TEAA-Puffer 50ml Transgenomic
 - o HPLC-Wasser add 1000ml Merck
- Puffer B: 0,1M TEAA pH 7,0, 25% Acetonitril
 - o TEAA-Puffer 50ml Transgenomic
 - o Acetonitril 250ml J.T.Baker Acetonitrile Ultra Gradient, HPLC Grade
 - o HPLC-Wasser add 1000ml Merck
- Puffer C: 75% Acetonitril in Wasser (zum Waschen der Säule)
- Puffer D: 8% Acetonitril in Wasser (zum Waschen der Schleife und Nadel)
- Gerät: Wave DNA Fragment Analysis System, Transgenomic Inc., (Omaha, USA)

b) Methode

Die Mutationsanalyse erfolgt auf dem Wave DNA Fragment Analysis System von Transgenomic (Omaha, USA) unter teils denaturierenden Bedingungen und einem linearen Acetonitrilgradienten. Das Prinzip wurde weitestgehend so übernommen, wie es von Oefner et al, 1995 und 1998, beschrieben worden war.

Die zu untersuchende DNA-Probe wird bei 95°C über fünf Minuten denaturiert und anschließend kontinuierlich durch Abkühlung bis 65°C in Gradschritten pro Minute renaturiert; dadurch entstehen im Falle eines heterozygoten Genotyps so genannte Heteroduplex-DNA-Stränge, d.h. DNA-Stränge mit Fehlpaarungen: es lagern sich die vorher denaturierten Einzelstränge im Renaturierungsprozess nach dem Zufallsmuster wieder zusammen, so dass im heterozygoten Fall vier Varianten entstehen, wie in folgender Abbildung (Abb. 4) demonstriert wird.

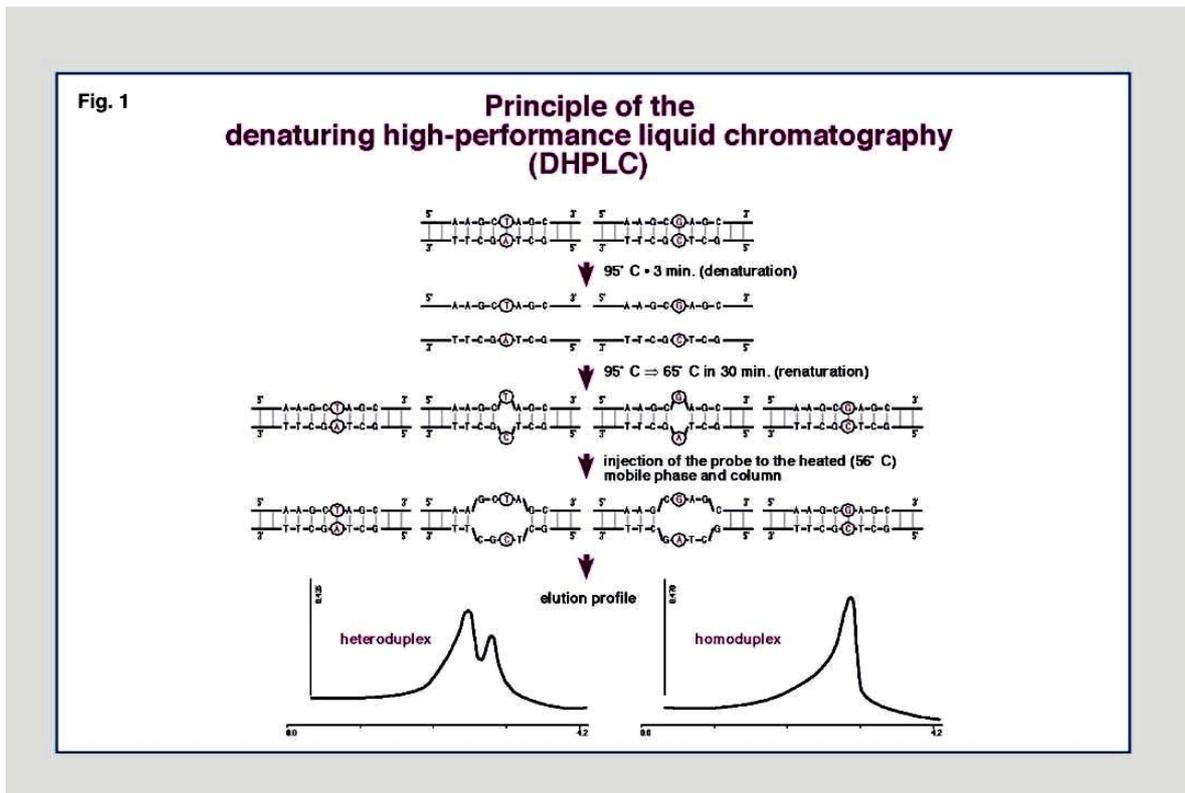


Abbildung 4: Darstellung der Doppelstrang-Varianten und der Chromatogramme nach De- und Renaturierungsprozess auf der DHPLC beim Wildtyp und einem heterozygoten Genotyp

Anschließend werden fünf μl jeder Probe auf eine vorgeheizte C18 *reversed phase* Säule aufgetragen, die auf nicht-porösen Poly(Styren-Divinylbenzen) Partikeln basiert (DNA-Sep., Transgenomic). Im folgenden Schritt wird die DNA mit einer Flussrate von 0,9 ml/min in einem linearen Acetonitril-Gradienten, der aus Puffer A und Puffer B besteht, ausgewaschen. Aufgrund unterschiedlicher Haftung von Heteroduplex- und Homoduplex- Molekülen an der Säule resultiert deren zeitlich verzögerte Lösung, so dass im Chromatogramm ein Doppelpack bzw. Mehrfachpeak sichtbar wird: die Heteroduplex-Moleküle weisen unter partieller Hitzedenaturierung eine geringere Bindungsaffinität zu der auf Kunststoff basierenden Säulenmatrix auf, so dass sie in dem linearen Acetonitrilgradienten eher als die intakten Doppelstränge von der Säule abgetrennt werden. Der genaue Acetonitril-Gradient wird so gewählt, dass die DNA nach vier bis fünf Minuten als Peak sichtbar wird.

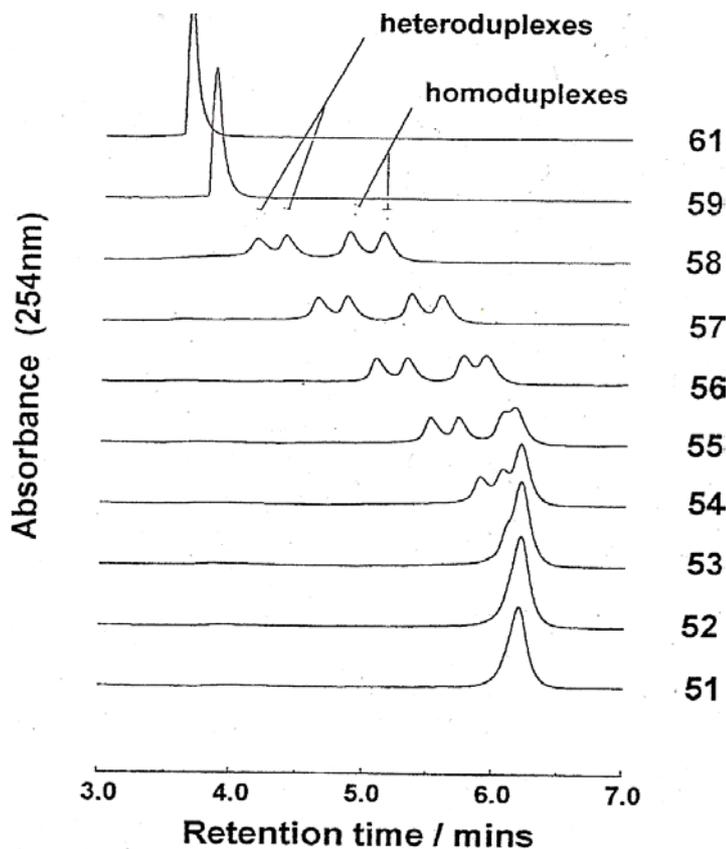


Abbildung 5: Temperatur-abhängige Unterscheidung der Heteroduplex- von Homoduplex-Molekülen: nur bei passender Temperatureinstellung lassen sich die Fragmente durch exakte Darstellung der Peaks analysieren.

Die Temperatur, die verwendet werden muss, um optimale Heteroduplex Unterscheidung zu erhalten, ist für jedes Fragment aufgrund dessen Basenverteilung spezifisch; G und C reiche Fragmente benötigen eine höhere Schmelztemperatur als Fragmente mit einem höheren Anteil an A und T. Die exakten Chromatogramme werden nur bei passender Temperatureinstellung sichtbar (Abb. 5). Ein prädiktiver Annäherungswert ist zu beziehen entweder über die DHPLC Melt Software unter der Website <http://insertion.stanford.edu/melt.html> oder die Wave Maker Software von Transgenomic.

Um keine Variante zu übersehen, wird jedes Fragment zusätzlich mit einer Säulentemperatur ein und zwei Grad niedriger und höher unter sonst gleichen Bedingungen analysiert.

Sobald eine Variante in einem Exon oder einer bestimmten Schmelzdomäne entdeckt und mittels Sequenzierung verifiziert ist, dient genau diese Probe als positive Kontrolle für die folgenden Analysen dieses bestimmten Fragments; dadurch werden sowohl die optimale Temperatur als auch die gesamten Analysenbedingungen

überprüft. Da jede Variante ein spezifisches Peakmuster im Chromatogramm bewirkt, können die noch unbekanntes Proben anhand des Vergleichs mit dem bekannten Chromatogramm bei Übereinstimmung dieser bestimmten Variante zugeordnet werden.

Um homozygote Variationen zu identifizieren, die sich allenfalls durch eine geringe zeitliche Verzögerung des Peaks im Chromatogramm vom Wildtyp unterscheiden, werden deren PCR-Produkte jeweils mit einem bekannten Wildtyp des selben Fragments gemischt, so dass nach der Denaturierung im Anlagerungsschritt der DHPLC wiederum Heteroduplex-Moleküle aus dem vermeintlich homozygotem Genotyp und dem gesicherten Wildtyp entstehen; in Folge dessen stellen sich im Chromatogramm doppelgipfelige Kurven als Ausdruck der zufälligen Aneinanderlagerung von Wildtyp- und variierten Einzelsträngen sowie andererseits der homozygoten Doppelstränge dar.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass ein großer Teil der Proben nicht mehr sequenziert werden muss. Jede neue oder unbekanntes Variation wird zunächst durch Sequenzierung verifiziert und im Detail dargestellt; häufige und sich wiederholende Veränderungen stellen sich in der DHPLC aufgrund des spezifischen etablierten Temperaturprofils und des Kurvenprofils identisch dar, so dass bei identischen Chromatogrammen von der selben Sequenz ausgegangen werden kann (Gross et al, 2000, Nickerson et al, 2000). Mittels der denaturierenden high performance liquid chromatography (DHPLC) (Oefner et al, 1995, 1998) lassen sich bei hoher Sensitivität (92-100%) und Spezifität in kurzer Zeit große Mengen an Sequenzvarianten aufdecken (Gross et al, 1999, 2000, 2001). Durch die Ermittlung der genauen Analysebedingungen eines jeden einzelnen Fragments eines Gens kann die optimale Sensitivität erreicht werden.

5. Sequenzierung

a) Material

- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	2µl	Applied Biosystems
- QUIAquick Gel Extraktion/Purification Kit		Quiagen
- EtOH 100%	25µl	
- Na-Acetat 3M	1µl	
- Sequenzer ABI PRISM 3100		Applied Biosystems

b) Methode

Die Sequenziermethode nach Sanger et al, 1977, beruht auf dem Prinzip des durch Didesoxynukleotide verursachten Syntheseabbruchs während der sog. Sequenzier-Cycle-Reaktion, einem PCR-ähnlichen Prozess, an dem als Enzym die Sequinase, als Template in der Regel ein PCR-Produkt, neben Desoxynukleotiden (dNTPs) zusätzlich Didesoxynukleotide (ddNTPs) und entweder ein Vorwärts- oder Rückwärts-Primer beteiligt sind. Als Kit ist der *Big-Dye Sequence Cycle Mix* von *Applied Biosystems* verwendet worden.

Die Sequenzierung erfolgt grundsätzlich in zwei Hauptschritten:

1. Sequenzier-Cycle-Reaktion: Hier entstehen durch die Wirkung der Didesoxynukleotide Fragmente von Nukleinsäuren, die sich in ihrer Länge unterscheiden, da der Einbau eines solchen "Abbruch-Nukleotids" zufällig erfolgt, so dass statistisch gesehen an jeder Position des zu sequenzierenden Templates mindestens einmal die Synthese abgebrochen worden ist. Diese Fragmente stimmen also in ihrem 5'-Ende, das der Primer festlegt, überein, besitzen aber variable 3'-Enden mit einem der vier unterschiedlich fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide (*Big Dye*).

Für die Sequenzier-Cycle-Reaktion selbst werden 50-100ng PCR-Produkt benötigt, das zuvor mit dem PCR-Reinigungs-Kit von *Quiagen* von überschüssigen Nukleotiden und störenden Primerresten der PCR-Reaktion gereinigt worden

ist (Abb. 6a).

Nach Abschluss der Sequenzier-Cycle-Reaktion (Abb. 6b) wird das entstandene Sequenzprodukt analog zur unter Punkt 1 beschriebenen DNA-Fällung (allerdings mit 1µl 3M NaAc und 25µl 100% EtOH) ausgefällt und getrocknet.

a) Reaktionsansatz:

BigDye	2µl
DNA (PCR-Produkt)	5µl
Primer	0,2µl
H ₂ O	auf 10µl auffüllen

b) Sequenzier-Programm:

Step	Temp	Time
1	96°C	30s
2	50°C	15s
3	60°C	4min
	25 Zyklen	

Abbildung 6: a) Reaktionsansatz zur Reinigung des PCR-Produkts zur Sequenzierung

b) Sequenzier-Programm

2. Sequenz-Detektion (automatisch) und Analyse: Die Proben werden auf einem automatischen Sequenziergerät (ABI377, Applied Biosystems) in einem Polyacrylamidgel (4-5%) elektrophoretisch aufgetrennt; ein Laser detektiert die vier ddNTPs über ihre fluoreszierende Gruppe. Mit dem Computerprogramm *Sequencing Analysis 3.7* von *Applied Biosystems* werden die Sequenzrohdaten berechnet und als Elektropherogramme dargestellt. Zum Vergleich mehrerer Sequenzen miteinander (sequence alignment) wird das Programm *Sequence Navigator* verwendet.

Anschließend werden die automatisch erhaltenen Sequenzen einzeln manuell durchgegangen und auf Plausibilität und Korrektheit kontrolliert.

6. Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium

Mithilfe des Programms Hplus wurden die Haplotypen geschätzt; dafür wurden die 23 Loci der untersuchten Mutationen verwandt, wobei mindestens ein Allel von einer Alteration betroffen sein musste. Diese Software wurde so verwendet, wie es von Zhao et al, 2003, beschrieben worden war.

Zur Bestimmung des Linkage Disequilibrium wurde die von Ding et al, 2003, veröffentlichte Analysemethode verwandt, die auch unter www.chgb.org.cn/lda/lda.htm erhältlich ist. Anhand dessen lassen sich paarweise die Messungen für D' und r^2 bestimmen und somit eine Aussage über die Kopplung zweier Genorte machen.

7. Aus anderen Untersuchungen verwendete Ergebnisse

a) DPD-Aktivitätsmessung

Aus dem Kollektiv der Populationsstudie wurde zusätzlich bei einer Anzahl von 100 Personen die Aktivität des Enzyms gemessen.

Aus den frischen, am Morgen entnommenen Blutproben, da zu dieser Zeit die höchste Aktivität nachgewiesen werden kann, wurden die Zellen des peripheren mononukleären Systems (PBM-Zellen) isoliert. Aus den gefrorenen Zell-Pellets wurde nach Johnson et al, 1997, mittels HPLC Radio Assay die Enzymaktivität gemessen. Diese Analyse wurde von R. Diasio, Departement of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, USA, durchgeführt.

a) Strukturanalyse der DPD

Die Aktivität der DPD ist großen Schwankungen unterworfen, so dass es sich für funktionelle Studien anbietet, anhand der dreidimensionalen Struktur des Enzyms zusätzlich weitere Informationen über funktionell essentielle Loci zu erhalten und infolgedessen Aussagen über funktionseinschränkende Mutationen treffen zu können.

Da das humane Enzym DPD bislang nicht kristallisiert werden konnte, wurde für die Strukturanalyse die Dihydropyrimidinehydrogenase des Schweins verwendet. Die Homologie zwischen humaner und der DPD des Schweins liegt bei 93%.

Die Kristallstruktur wurde mithilfe des SWISSMODELS und den verfügbaren Sequenz-Vorlagen des Schweine-DPD nachempfunden, wie es Dobritzsch et al, 2002, und van Kuilenburg et al, 2002, beschrieben haben. Die Strukturanalyse wurde mit der Software Molac und Accelrys ViewerLite 4.2 (www.accelrys.com) durchgeführt.

b) Statistik

1. Hardy-Weinberg-Equilibrium

Die Häufigkeiten der Genotypen der analysierten Population wurden mithilfe eines Standard χ^2 -Tests auf die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium untersucht (Weir et al, 1996).

2. Statistik (Bootstrap Analyse)

Um die Genotypen mit den funktionellen Daten zu vergleichen und zu korrelieren, wurde die DPD Aktivität als Variable eingesetzt. Die statistische Analyse wurde im 95%-Konfidenzintervall mit Bootstrap Analyse durchgeführt.

IV. Ergebnisse

1. Etablierung des Analyseverfahrens und der Methodik zur Detektion von DPD-Varianten

a) PCR

Die Primer wurden größtenteils so übernommen, wie sie von van Kuilenberg, 2000, veröffentlicht worden waren; da jedoch Unterschiede in den Sequenzen zwischen der von van Kuilenburg veröffentlichten und der der NCBI-Datenbank bestehen, mussten die für die Replikation günstigeren Primer zunächst experimentell ermittelt werden.

Die Sequenzen der Primer mussten bei Exon 3, 4, 8, 9, 12, 15 und 21 zum Teil neu entworfen und für die PCR-Effektivität optimiert werden, für das Exon 18 wurde das PCR-Protokoll optimiert, um ein sauberes PCR-Produkt zu erhalten. Dieses wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels HPLC überprüft. Unter nicht denaturierenden Bedingungen lässt sich im HPLC-Chromatogramm ein sauberer Einzelpeak erkennen, wie in Abbildung 7 zu sehen ist. Zugleich wird anhand eines Vergleichs mit der Auftrennung eines HAEIII-Verdau des bakteriellen PUC-Plasmids (Transgenomic) die Länge des PCR-Fragments in Basenpaaren abgeschätzt .

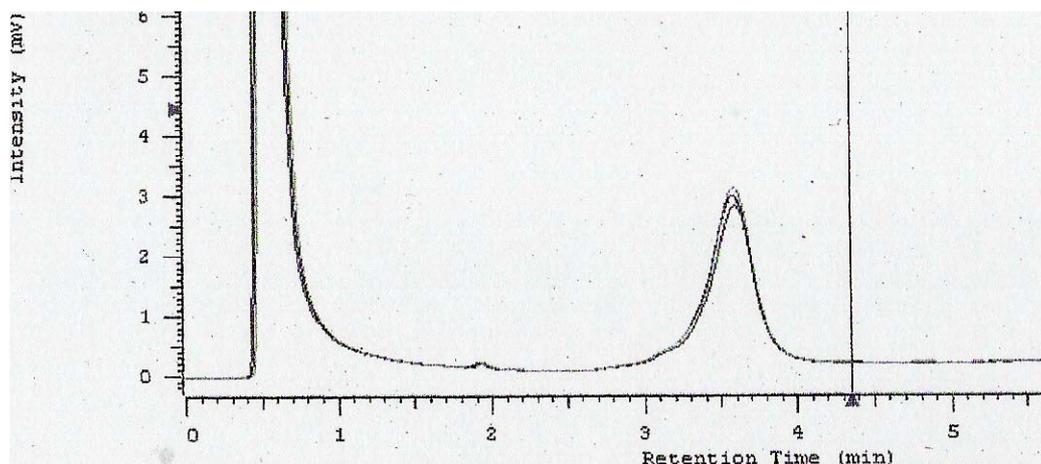


Abbildung 7: Darstellung eines sauberen PCR-Produkts anhand eines klaren Einzelpeaks im Chromatogramm unter nicht denaturierenden Bedingungen

b) DHPLC

Mithilfe der denaturierenden HPLC wurde eine Mutationsanalyse des gesamten kodierenden Abschnitts des DPYD-Gens durchgeführt.

Für jedes Exon und teilweise für einzelne Schmelzdomänen eines Exons wurden die optimale DHPLC-Temperatur dieser Domäne und der Elutionsgradient anhand von Berechnung sowie des Weiteren experimentell ermittelt.

Dies kann anhand des Exons 13 veranschaulicht werden (Abb. 8):

Bei 58°C konnten drei verschiedene Varianten im Chromatogramm dargestellt werden, bei 52°C zwei verschiedene. Diese konnten jeweils einem bei höherer Temperatur schmelzenden Teil bzw. einer bei niedrigerer Temperatur schmelzenden Domäne zugeordnet werden.

In Abbildung B (1627A>G) und C (1601G>A) kann man jeweils einen bestimmten Genotypen differenzieren; jedes der beiden Chromatogramme ist charakteristisch für die spezifische Variante und kann des Weiteren als Kontrolle und Mustervorlage für weitere Analysen dienen.

Das Chromatogramm D zeigt das gleichzeitige Vorhandensein von beiden Mutationen bei einem Probanden (1601G>A und 1627A>G): der führende Heteroduplex-Peak der Doppelmutation wurde früher eluiert als die korrespondierenden Heteroduplexe der einfach Heterozygoten.

In F (IVS13+39c>t) kann man als Beispiel das potentielle Trennvermögen der Methode betrachten: die Intronvariante zeigt die Unterscheidung durch zwei Heteroduplex und Homoduplex-Peaks, die durch das Wiedereinanderlegen der DNA-Stränge gebildet werden. In Bild G werden beide Intronvarianten abgebildet: IVS13+39c>t und IVS13+40a>g. Hieran lässt sich verdeutlichen, wie das Muster der Peaks von der Sequenz des PCR-Produkts abhängt, insbesondere von der Sequenz, die in der Nähe des mismatch Basenpaares lokalisiert ist.

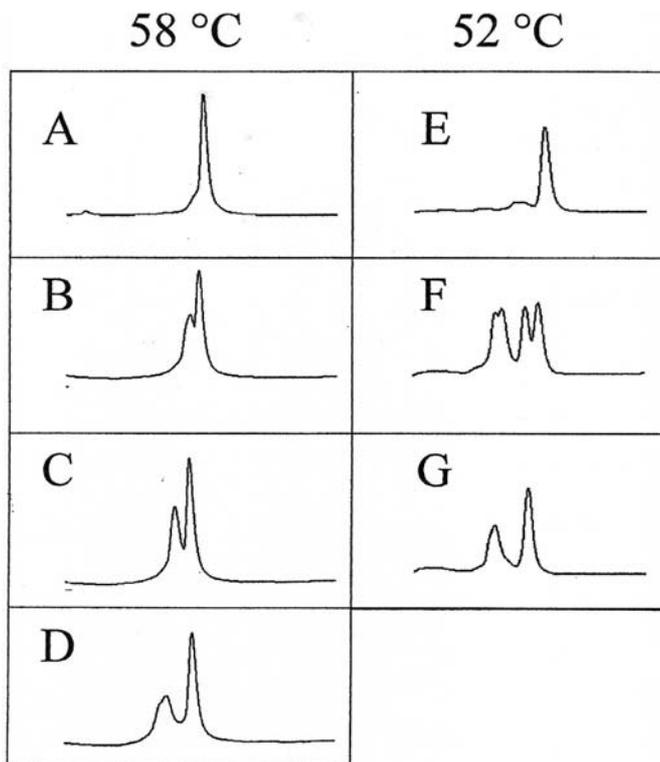


Abbildung 8: Chromatogramme des Exons 13 bei unterschiedlichen Temperaturen; Unterscheidung der verschiedenen Genotypen.

A und E zeigen jeweils den Wildtypen,

B: 1627A>G, C: 1602G>A, D: 1601G>A + 1627A>G,

F: IVS13+39c>t, G: IVS13c>t + IVS13+40a>g.

Zur optimalen Darstellung der Chromatogramme und visuellen Differenzierung der Genotypen musste noch der Elutionsgradient der Puffer zur Trennung der Heteroduplex-Moleküle in Kombination mit der Analysentemperatur variiert werden. Dieser Gradient ist wiederum abhängig von der Fragmentgröße und musste dementsprechend für jedes einzelne Fragment adjustiert werden.

Ziel und Anspruch dieser gesamten Arbeit war, durch das jeweilige Chromatogramm eine definitive Zuordnung zu Wildtyp oder zu spezifischen bekannten Mutanten treffen zu können. Diese Differenzierung zeigt Abb. 9.

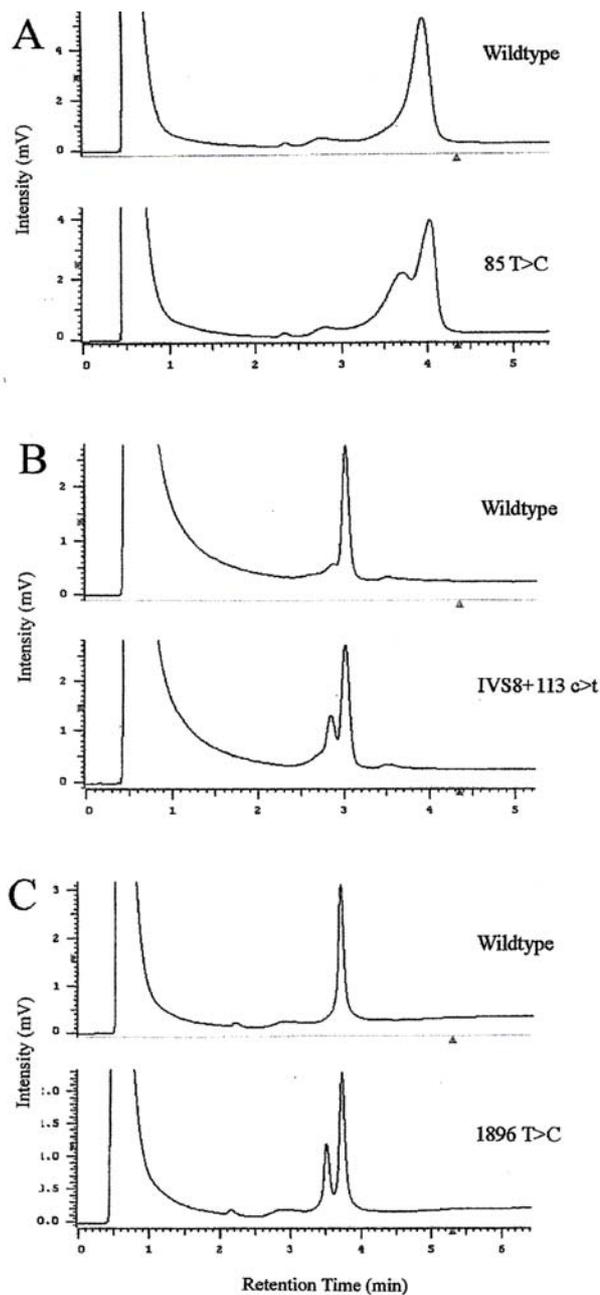


Abbildung 9: Darstellung einiger Exons im Wildtyp und der spezifischen Chromatogramme der Mutationen:

A zeigt die spezifische Darstellung des Exon 2 sowohl als Wildtyp als auch den Polymorphismus 85T>C (Cys29Arg).

B stellt neben dem Wildtyp die charakteristische Intronvariante IVS8+113c>t dar.

In C kann man das Chromatogramm der Variante 1896T>C im Exon 14 erkennen.

Durch die genaue Aufarbeitung der einzelnen Analysebedingungen wurde es möglich, dass für jedes Exon und jede einzelne Schmelzdomäne die spezifischen DHPLC-Bedingungen wie Schmelztemperatur und Elutionsgradient optimiert wurden und als Standards dienen konnten.

Die Spezifität und Sensitivität der denaturierenden HPLC zur Mutationsanalyse, die von Oefner et al, 1995 und 1998, erstmals gezeigt worden war, wurde ständig überprüft und bestätigt: stichprobenartige Kontrollen bestätigten in der Sequenzierung den durch die DHPLC erwarteten Genotyp.

Infolgedessen dienten die einmal durch Sequenzierung bestätigten Proben als Kontrolle zur Validierung neu zu analysierender Genotypen: jeder neu zu analysierende Proband wurde gleichzeitig mit einer bekannten Probe des Wildtyp-Probanden sowie einer - soweit vorhandenen – Probe mit Mutation verglichen. Sich deckende Chromatogramme standen infolgedessen für den identischen Genotyp des untersuchten Exons. Somit wurde die Sequenzierung nur bei neuen oder unklaren Chromatogrammen bzw. Genotypen nötig. Dies bedeutet, dass mithilfe der optimierten DHPLC eine höchst sensitive und spezifische Methode zur Durchführung einer groß angelegten Studie zur Verfügung stand und nach Evaluierung der exakten Analysenbedingungen ein Screening einer großen Probandengruppe durchgeführt werden und mit genauesten Ergebnissen bewältigt werden konnte.

2. DPD Mutationen

a) Normalbevölkerung

Es wurden 157 zufällig ausgewählte gesunde Personen unterschiedlichen Alters und Geschlechts analysiert; jedes der 23 Exons und die angrenzenden Exon-/Intronabschnitte der DPYD eines jeden Probanden wurde einzeln untersucht, gegebenenfalls wurden einzelne Abschnitte eines Exons gesondert analysiert, falls es die Länge des Exons oder das Vorhandensein von unterschiedlichen Schmelzdomänen erforderlich machten. Die Untersuchung der Probanden ergab, dass über die gesamte kodierende Sequenz und die sich anschließenden Intronregionen des DPYD-Gens in der Durchschnittbevölkerung verschiedenste Varianten in unterschiedlicher Häufigkeit verteilt sind. Dies zeigt Tabelle 3:

Exon/ Intron	Mutation	Allel	Effekt	Heterozygote/ 157	Homozygote/ 157	beobachtete Allel Häufigkeit (%)	geschätzte Allel Häufigkeit (%)	HWE p-Wert
2	85T>C	DPYD*9A	Cys29Arg	51	5	19.4	0.19	0.64
4	295delTTCAT	DPYD*7	Deletion	1	0	0.3	0.003	0.97
5	IVS5+14g>a		-	3	0	0.96	0.01	0.9
5	IVS5-8c>t		-	1	0	0.3	0.003	0.97
6	496A>G	Met166Val	Met166Val	23	1	7.9	0.08	0.996
8	IVS8+113c>t		-	1	0	0.3	0.003	0.97
9	IVS9+36a>g		-	1	0	0.3	0.003	0.97
9	IVS9-51t>g		-	5	0	1.6	0.016	0.84
10	IVS10-15t>c		-	32	4	12.7	0.13	0.297
10	IVS10-28g>t		-	1	0	0.3	0.003	0.97
11 ¹	1218G>A	Met40Ile	Met40Ile	3	0	0.96	0.01	0.9
11 ¹	1236G>A	Glu412Glu	Glu412Glu	1	0	0.3	0.003	0.97
11	IVS11-106t>a		-	21	0	6.7	0.07	0.37
11	IVS11-119a>g		-	2	0	0.6	0.006	0.94
13	1601G>A	DPYD*4	Ser534Asn	5	0	1.6	0.016	0.84
13	1627A>G	DPYD*5	Ile543Val	37	3	13.7	0.14	0.97
13	IVS13+39c>t		-	n.a. ²	n.a.	-		
13	IVS13+40g>a		-	n.a.	n.a.	-		
14	1896T>C	Phe632Phe	Phe632Phe	11	0	3.5	0.04	0.65
15	IVS15+16g>a		-	1	0	0.3	0.003	0.97
15	IVS15+75a>g		-	48	2	16.6	0.17	0.18
18	2194G>A	DPYD*6	Val732Ile	7	0	2.2	0.02	0.78
18	IVS18-39g>a		-	31	1	10.5	0.11	0.53
22	2846A>T	Asp949Val	Asp949Val	2	0	0.6	0.006	0.94
23 ¹	3067C>T	Pro1023Ser	Pro1023Ser	1	0	0.3	0.003	0.97

¹ neu entdeckte Mutationen
² nicht analysiert im Detail

Tabelle 3: DPYD-Mutationen der 157 Normalpersonen

Die Häufigkeit der Allele liegt zwischen 0,3% und 19,4%, was auf das Vorhandensein von sowohl seltenen Varianten als auch von häufigen Polymorphismen hinweist. Die beobachtete Allel-Häufigkeit jeder einzelnen Variante liegt mit der berechneten Frequenz im Hardy-Weinberg-Equilibrium. In den Regionen der Exons wurden insgesamt elf Varianten entdeckt, wobei drei von diesen in der Literatur noch nicht beschrieben worden waren: im Exon 11 1218G>A (Met406Ile), weiterhin im Exon 11 die stille Mutation 1236G>A (Glu412Glu) sowie im Exon 23 3067C>T (Pro1023Ser). In den Intronregionen ließen sich 14 unterschiedliche, teils noch nicht beschriebene Alterationen darstellen, die hinsichtlich der Häufigkeit ein breites Spektrum bieten: einige ließen sich nur bei einem einzelnen Probanden nachweisen, währenddessen zum Beispiel die Intronvarianten des Exon 13 und 15 bei einer großen Anzahl an Normalpersonen auftraten.

Einige dieser Varianten, die von vielen Autoren als Polymorphismen bezeichnet werden, wie 85T>C (Cys29Arg, DPYD*9A), 1627A>G (Ile543Val, DPYD*5), 1896T>C (Phe632) und 2194G>A (Val732Ile, DPYD*6) (van Kuilenberg et al, 2003; Collie-Duguid et al, 2000; Johnson et al, 2002; Gross et al, 2003), traten in der Populationsstudie in einer auf Polymorphismen hinweisenden erhöhten Allelfrequenz von 2,2% bis 19,4% auf.

Bei fünf Personen wurde die bisher sehr unterschiedlich bewertete Alteration 1601G>A (Ser534Asn, DPYD*4) beobachtet; in den veröffentlichten Studien von van Kuilenburg und Collie-Duguid herrscht eine kontrovers geführte Diskussion darüber, ob es sich um einen allgemeinen Polymorphismus oder eine DPD-Insuffizienz verursachende Variante handelt (van Kuilenberg et al, 2003; Collie-Duguid et al, 2000). Eine abschließende Beurteilung ist noch zu fällen.

Es konnten in der Mutationsanalyse drei seltene, bisher nicht beschriebene Mutationen nachgewiesen werden:

Die Alteration 1218G>A (Met406Ile) im Exon 11 zeigte sich bei zwei Personen, wobei einer derer ebenso die Deletion des Exons 4 (del295-298TCAT, DPYD*7) aufweist; die zweite Person zeigte eine weitere bisher unbekannt Mutation im Exon 23: 3067C>T (Pro1023Ser).

Bei einer Normalperson wurde ebenso im Exon 11 die dritte unbeschriebene Alteration 1236G>A, die zu einer stillen Mutation ohne Aminosäureaustausch führt (Glu412Glu), nachgewiesen.

Schließlich wurde die Variante des Exon 22, 2846A>T (Asp949Val), bei zwei Normalpersonen identifiziert, die ebenso bei zwei vermutlich DPD-insuffizienten Patienten (van Kuilenburg et al, 2000; Ezzeldin et al, 2003) aufgetreten war.

Zur weiteren und exakten Klassifizierung der verschiedenen Mutationen in harmlose Polymorphismen oder in DPD-Insuffizienz verursachende Alterationen müssen weitere Untersuchungen und Vergleiche angestellt werden:

Zusätzlich zu einer Haplotypenanalyse wurden die Genotypen der Normalpersonen sowohl mit funktionellen Informationen wie Enzymaktivität als auch mit Daten zur dreidimensionalen Proteinstruktur verglichen.

b) Patienten

Bei Patientin 1, die unter dem ersten Doppelzyklus CMF mit schwerer Mucositis Grad III und rapider Verschlechterung des Allgemeinzustandes reagiert hatte, konnten folgende Mutationen nachgewiesen werden:

Die Variante im Exon 2 85T>C (Cys29Arg) trat im heterozygoten Zustand auf; des Weiteren zeigte sich eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Variante des Exon 8 775A>G (Lys259Glu), ebenfalls heterozygot, deren Effekt auf die DPD-Funktion noch der Klärung bedurfte. Schließlich wurde eine heterozygote Intronvariante in der Analyse gefunden: IVS18-39g>a.

Alle Exons wurden in der direkten Sequenzierung überprüft und die in der DHPLC identifizierten Varianten bestätigt.

Die DPD-Enzymaktivität dieser Patientin lag bei 0,13 nmol/min/mg Protein. Der in der Literatur von Johnson et al, 1997, festgelegte Referenzbereich, demnach ab Werten unter 0,06 nmol/min/mg Protein von einer Funktionseinschränkung gesprochen wird, ist weit überschritten, so dass von Seiten des Aktivitätstestes nicht von einem insuffizientem Protein gesprochen werden kann. Weiterhin wird auf der Website www.dpdenzyme.com ebenfalls der Referenzbereich der DPD-Aktivität definiert: 0,064 – 0,314 nmol/min/mg Protein. Auch anhand dieser Definition liegt der bei der Patientin gemessene Aktivitätswert nicht im reduzierten Bereich.

Patientin 2, ebenfalls eine wegen eines Mamma-Carcinoms mit adjuvantem CMF-Schema behandelte Patientin, wies multiple Alterationen auf:

es zeigten sich insgesamt vier Intronvarianten: IVS11-106t>a, IVS13+39c>t, IVS13+40g>a und IVS18-39g>a. Diese Varianten traten in der untersuchten Normalpopulation ebenfalls und in großer Häufigkeit auf.

Des Weiteren zeigte diese Patientin die beiden ebenfalls in der Normalpopulation häufig auftretenden Alterationen im Exon 2 85T>C (Cys29Arg) sowie im Exon 6 496A>G (Met166Val). Jedoch ließen sich zwei weitere Mutationen jeweils im Exon 13 nachweisen, wobei eine der beiden bisher kontrovers als DPD-Insuffizienz bewirkend diskutiert wird: 1601G>A (Ser534Asn). Der auch in der untersuchten Population häufig auftretende Polymorphismus des Exons 13 1627A>G (Ile543Val) zeigte sich ebenfalls bei der Patientin. Alle diese Varianten traten im heterozygoten Zustand auf und wurden wie die Exons ohne eine in der DHPLC detektierter Mutation mittels direkter Sequenzierung bestätigt.

Der Aktivitätstest zeigte eine Reduzierung der DPD-Aktivität: der Wert lag bei 0,02 nmol/min/mg Protein, was nach Johnson et al per definitionem im Bereich der DPD Insuffizienz liegt.

Bei Patientin 3, die unter 5-FU-Infusion erhöhte Toxizitätserscheinungen gezeigt hatte, konnten lediglich zwei Alterationen nachgewiesen werden: im Exon 2 erschien im heterozygoten Zustand die Mutation 85T>C (Cys29Arg), sowie im Intron 13 ebenso nur ein Allel betreffend die Variante IVS13+40g>a. Beide in der DHPLC aufgefallenen Alterationen wurden in der Sequenzierung bestätigt. Alle weiteren Exons wiesen die Sequenzen des Wildtyps auf.

Diese Patientin war für einen Aktivitätstest leider nicht mehr verfügbar.

Bei der Patientin 4, die ebenfalls bei Behandlung mit dem Mayo-Protokoll starke Unverträglichkeitsreaktionen gezeigt hatte, trat die oftmals gekoppelte Mutationsvariante im Exon 6 496A>G (Met166Val) zusammen mit der Intronvariante IVS10-15t>c auf. Es ließen sich zwei weitere auch häufig in der Normalpopulation vorkommende Intronvarianten nachweisen: IVS 11-106t>a sowie die Variante IVS15+75a>g. Schließlich zeigte sich die kontrovers diskutierte Variante im Exon 13 1601G>A (Ser534Asn), deren Wertigkeit besonders bei vermuteter 5-FU-Unverträglichkeit noch zu diskutieren ist. Auch bei dieser Patientin wurden die mithilfe der DHPLC gewonnenen Ergebnisse mit direkter Sequenzierung verifiziert.

Diese Patientin zeigte im Aktivitätstest einen Messwert von 0,07 nmol/min/mg Protein, was zwar nicht direkt für eine Insuffizienz spricht, jedoch im untersten Normbereich liegt und für eine tendenziell verringerte Aktivität und Funktion sprechen könnte.

Mutation (Allel, Effekt)	Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4
85T>C (DPYD*9A, Cys29Arg)	+	+	+	-
496A>G (Met166Val)	-	+	-	+
775A>G (Lys259Glu)	+	-	-	-
IVS10-15t>c	-	-	-	+
IVS11-106t>a	-	+	-	+
1601G>A (DPYD*4, Ser534Asn)	-	+	-	+
1627A>G (DPYD*5, Ile543Val)	-	+	-	-
IVS13+39c>t	-	+	-	-
IVS13+40g>a	-	+	+	-
IVS15+75a>g	-	-	-	+
IVS18-39g>a	+	+	-	-
Aktivitätswert (nmol/min/mg Protein)	0,13	0,02	-	0,07

Tabelle 4: Übersicht der bei den Patientinnen festgestellten Varianten und deren DPD-Aktivitätswerte

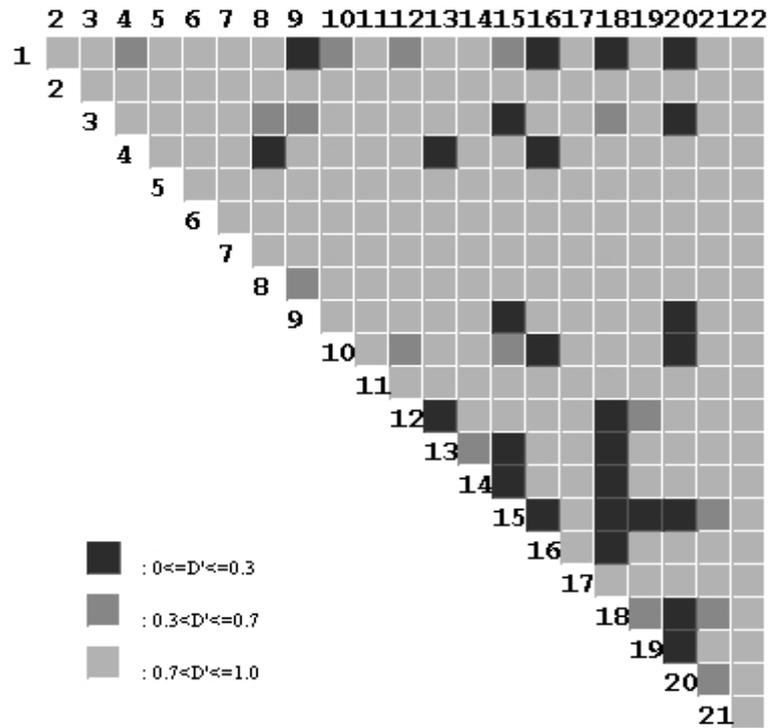
3. Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium

Mit freundlicher Unterstützung von Paul Pharoah und Bettina Kuschel wurde die Haplotypenanalyse und Untersuchung des *Linkage Disequilibrium* durchgeführt. Wir schätzten die Häufigkeiten der Haplotypen anhand von 23 Loci, die mindestens aus einem alterierten Allel bestehen. Ein jeder Locus stellt eine Alteration im DPYD-Gen dar, wie sie in Tabelle 5 aufgelistet sind. Es ergaben sich insgesamt 62 mögliche Haplotypen, wobei jedoch nur 15 derer mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftraten und die als „häufige“ Haplotypen bezeichnet wurden. Diese sind in folgender Tabelle 5 dargestellt:

Haplotyp	Loci 1-23	Häufigkeit	Standard Abweichung
1)	TTGCACATTGGGTAGATGAGGAC	0.41962	0.0217
2)	TTGCACATTGGGTAGG T GAGGAC	0.08229	0.0187
3)	CTGCACATTGGGTAGATGAGGAC	0.06696	0.0183
4)	TTGCACATTGGGTAGATGG GG GAC	0.05670	0.0217
5)	CTGC CG CATCGGGTAGATGAGGAC	0.03957	0.0130
6)	TTGCACATTGGGTAGATGAG AA C	0.02984	0.0174
7)	TTGCACATCGGGTAGATGAGGAC	0.02937	0.0144
8)	TTGCACATTGGG AA AGATGAGGAC	0.02225	0.0159
9)	CTGCACATTGGGTAGATGAG AA C	0.02095	0.0101
10)	TTGCACATTGGGTAGATGG GA AC	0.01486	0.0108
11)	TTGC CG CATCGGGTAGATGAGGAC	0.01412	0.0076
12)	TTGCACATTGGGTAGG T GGGGAC	0.01261	0.0170
13)	TTGCACATTGGGTAGACGAGGAC	0.01199	0.0098
14)	CTGCACATTGGGTAGATGG GG GAC	0.01181	0.0115
15)	TTGCACATTGGG AA AGATGGGGAC	0.01021	0.0121

Tabelle 5: Die 15 häufigen Haplotypen, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftreten. Die 23 Loci sind in 5' nach 3'Reihenfolge aufgelistet analog Tabelle 3. Die variable Position ist jeweils fett dargestellt.

Es besteht kein Hinweis darauf, dass zwischen den häufigen Varianten dieser Haplotypen ein *Linkage Disequilibrium* besteht. Dies spiegelt sich aus den Unterschieden der D' und r^2 Messungen wieder. Es lässt sich lediglich eine moderate Assoziation feststellen zwischen zwei Loci: 496A>G (Met166Val) und IVS10-15t>c. D' betrug 0,773, r^2 0,387 (Abb.10).



Pairwise Linkage Disequilibrium Measures of D'

Abbildung 10: Paarweise Messungen von D' und r^2 des Linkage Disequilibrium mithilfe des Programms LDA

V. Diskussion

1. Allgemeine Diskussion

Es wurde erstmals ein großes Kollektiv an Normalpersonen hinsichtlich der DPYD-Mutationen untersucht. Aus dieser Populationsstudie konnten grundlegende Ergebnisse erzielt werden, die über die Häufigkeit von Mutationen in der gesamten Bevölkerung Aufschluss geben sowie Hinweise zulassen auf die Einteilung in Polymorphismen und in Mutationen, die eine Störung der DPD-Funktion bewirken. Die Interpretation der vorliegenden Genotypen konnte mittels funktionellen Daten durchgeführt werden, so dass bei einigen Genotypen eine sichere Korrelation zu den Phänotypen möglich ist.

Jedoch zur vollständigen und abschließenden Beurteilung eines jeden Genotyps sollten diese in weiteren Studien untersucht werden. Es sollten alle Mutationen, die bisher nur im heterozygoten Zustand vorlagen, auch bei homozygoten Merkmalsträgern untersucht werden, da die Konsequenz des vollständigen Verlusts beider Allele bisher nur bei einigen Genotypen beurteilt werden konnte.

Nachdem jetzt die methodischen Grundlagen evaluiert und die Basisdaten gewonnen worden sind, könnte in folgenden Untersuchungen das Studiendesign erweitert werden: Es wurde erstmals ein großes Kollektiv von gesunden Normalpersonen hinsichtlich derer Genstruktur und DPD-Funktionalität analysiert; zum Vergleich wurden einige Patientinnen herangezogen, die unter Chemotherapie mit Fluoropyrimidinen Unverträglichkeitsreaktionen gezeigt hatten. Zur vollständigen Abklärung der DPD-Insuffizienz sollte das Kollektiv der Normalpersonen mit einer ebenso großen Anzahl von Patienten unter Fluoropyrimidinhaltiger Chemotherapie verglichen werden, wobei sowohl DPD-insuffiziente Patienten als auch solche ohne vermutete FU-Toxizität miteinbezogen werden sollten. Anhand dessen könnte eine Beeinträchtigung der Enzymfunktion allein durch die Gabe der Chemotherapie ausgeschlossen werden und eine bessere argumentative Basis für die Interpretation der DPD-Insuffizienz gewonnen werden.

Insgesamt wäre es anzustreben, eine möglichst hohe Fallzahl in jedem der drei Kollektive zu untersuchen, um eine statistische Signifikanz auch für seltene Mutationen erreichen zu können.

2. Aktivitätsdaten allgemein

Insgesamt standen für die Mutationsanalyse 157 gesunde Testpersonen unterschiedlichen Alters und Geschlechts zur Verfügung. Davon konnten bei 100 Normalpersonen ein Aktivitätstest durchgeführt werden, da das von Mitarbeitern der Firma Roche stammende Kollektiv Schwankungen unterworfen war und nicht mehr alle Probanden zur Verfügung standen.

Die von Prof. Robert Diasio (Alabama, USA) analysierten Aktivitätswerte stammen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBM-Zellen); die Spanne der erhaltenen Werte reicht von 0,08 nmol/min/mg Protein bis 0,25 nmol/min/mg Protein mit einem Mittelwert von 0,143 nmol/min/mg Protein. Nach Johnson et al, 1997, liegt der untere Wert des Referenzbereiches, ab dem man von potentieller DPD-Insuffizienz sprechen kann, bei 0,06 nmol/min/mg Protein; dieser Wert wurde somit von keiner der untersuchten Personen unterschritten. Ebenso wurden die von der Website www.dpdenzyme.com angegebenen Referenzwerte nicht unterschritten. Jedoch kann dies nur als Annäherung und nicht als absoluter Wert verstanden werden, da die Analysen nur innerhalb ihres Systems verglichen werden können, um eine relative systemische Abweichung nicht zu übersehen.

Betrachtet man die Verteilung der Aktivitätswerte (siehe Abb. 11), so kann man graphisch von einer Annäherung an die Gauss'sche Kurve sprechen; die Standardabweichung beträgt 0,04, der Mittelwert 0,143 nmol/min/mg Protein.

Der Vergleich der einzelnen Mutationen untereinander in ihrem mittleren Aktivitätswert ergibt eine Verteilung der Werte um den Gesamt-Mittelwert. Keine isolierte Mutation des vorliegenden Kollektivs verursacht eine erhebliche Störung der Enzymaktivität; auch bei Betrachtung von Mutationskombinationen zeigt sich keine erhebliche Herabsetzung des mittleren Aktivitätswertes und in keinem Fall eine Annäherung an den unteren Referenzbereich. Dies ist in Tabelle 6 dargestellt.

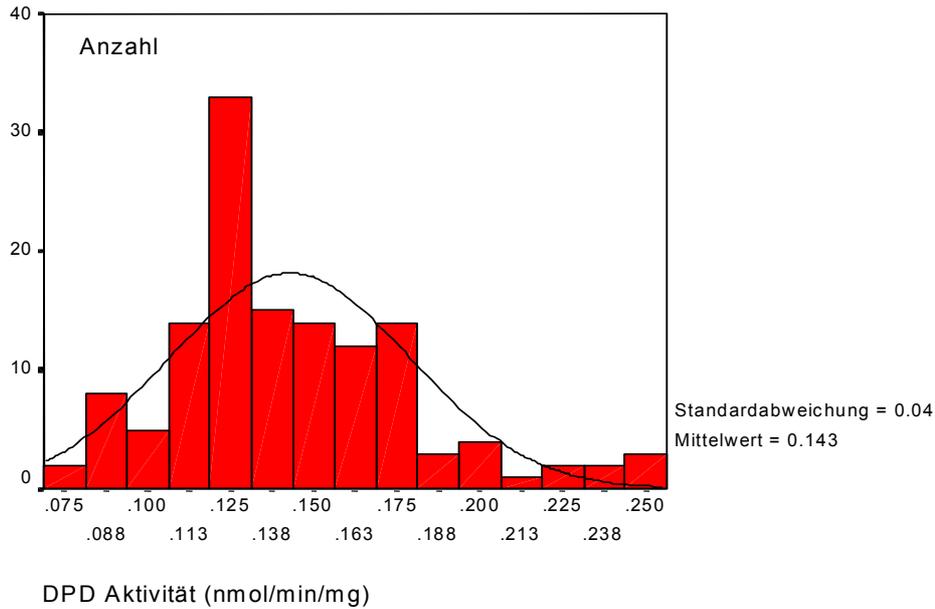


Abbildung 11: Verteilung der DPD-Aktivitätswerte an eine Gauss'sche Verteilung
Dargestellt ist die Anzahl von Probanden mit jeweils demselben Aktivitätswert. Legt man eine Gauss'sche Kurve darüber, so zeigt sich eine annähernde Deckung.

Mutation (heterozygot)	Mittelwert DPD Aktivität [nmol/min/mg]
85T>C	0,15
85T>C (homozygot)	0,13
496A>G	0,13
1601G>A	0,12
1627A>G	0,14
1627A>G (homozygot)	0,14
1896T>C	0,14
2194G>A	0,14
2846A>T	0,11
3067C>T	0,14
85T>C+496A>G	0,13
85T>C(homoz.)+496A>G	0,1
85T>C+496A>G+1627A>G	0,16
85T>C+1627A>G	0,13
1218G>A+3067C>T	0,14
1218G>A+85T>C(homoz.)+1627A>G	0,19

Tabelle 6: Darstellung von einzelnen Mutationen und Mutationskombinationen und deren mittlerer DPD-Aktivitätswert

Der niedrigste Wert von 0,1 nmol/min/mg Protein existiert bei der Kombination 85T>C (homozygot) mit 496A>G (heterozygot); allerdings liegt diese Kombination nur in zwei Fällen vor. Es kann wohl kaum von Repräsentabilität gesprochen werden, zumal der Wert der einen Person mit einem Aktivitätswert von 0,08 nmol/min/mg eher als Abweichung von der Norm zu betrachten sein könnte und der Aktivitätswert der zweiten Person im Normbereich bei 0,12 nmol/min/mg Protein liegt.

Leider konnte von dem Träger der Mutation 295-298delTCAT in Exon 4 (DPYD*7) kein Blut für einen Aktivitätstest erhalten werden. Eine herabgesetzte Aktivität wäre nach van Kuilenburgs et al, 1999, zu erwarten, da die Deletion der vier Basenpaare eine Verschiebung des Leserasters und einen Kettenabbruch bewirkt, wodurch die reguläre Proteinstruktur verändert wird; infolgedessen könnte auch im heterozygoten Fall ein teilweiser Funktionsverlust der DPD resultieren. Dies bedarf jedoch der Bestätigung durch Aktivitätsmessung.

3. Strukturdaten allgemein

Die Proteinstruktur der Dihydropyrimidinehydrogenase weist unter Säugern eine Homologie von 96-94% auf, was nach Mattison et al zeigt, dass die Aminosäurepositionen, die essentiell für Elektronentransfer, die Interaktion mit Substraten oder Kofaktoren sind, entlang der Evolution hochkonserviert sind. Eine hohe Sequenzähnlichkeit besteht zwischen der humanen DPD und der des Schweins mit 93%, im Vergleich mit Vertebraten liegt die Homologie zu *Drosophila melanogaster* bei 93% und zu *Caenorhabditis elegans* bei noch 79%.

Da die humane DPD nicht zur Strukturanalyse zur Verfügung steht, wird aufgrund der hohen Homologie die DPD des Schweines zur Analyse verwendet.

Die Strukturanalyse der Sequenz der DPD wurde von Tobias Ullrich, Roche Diagnostics, GmbH, Penzberg, wie von Dobritzsch et al, 2001 und 2002, beschrieben mit dem SWISSMODEL-Protokoll durchgeführt. Die Sequenz der Schweine-DPD diente als Vorlage, die Analyse der dreidimensionalen Proteinstruktur erfolgte mittels der Software Molac (Turk, 1992) und Accelrys ViewerLite 4.2, erhältlich unter www.accelrys.com.

4. Statistik: Bootstrap Analyse

Die statistische Analyse wurde freundlicherweise von Prof. Ron Kates durchgeführt.

Das Ziel der statistischen Analyse war die Identifizierung einer möglichen Assoziation zwischen Phänotyp (Ausmaß der DPD Aktivität) und funktionellen DPD Varianten. Zu diesem Zweck wurden auch alle potentiellen Haplotypen herangezogen, wovon für die statistische Analyse diejenigen verwendet wurden, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftraten.

In der Bootstrap Analyse zeigte sich im Vergleich der Haplotypen mit der mittleren DPD-Enzymaktivität einige signifikante Ergebnisse (siehe Tab. 7):

Mit einem erhöhten mittleren Wert der DPD Aktivität gingen zwei Haplotypen einher; zum einen der Haplotyp 3, der das Allel 85C trägt, sowie des Weiteren der die stille Mutation 1896C tragende Haplotyp 13.

Zwei der Haplotypen, die jeweils keine kodierenden Varianten tragen (IVS15+75G und IVS11-106A im Haplotyp 4 bzw. 8), scheinen mit reduzierter mittlerer Enzymaktivität korreliert zu sein. Diese Assoziation ist statistisch signifikant, obwohl nur wenige derartige Fälle vorliegen.

Das Allel 496G der Mutation Met166Val im Exon 6, das bei einigen 5-FU-Toxizität zeigenden Patienten identifiziert worden war (Johnson et al, 2002; Gross et al, 2003; Mattison et al, 2002), ist in zwei Haplotypen beinhaltet. Diese beiden Haplotypen 5 und 11 zeigten keine statistisch signifikante Reduktion der Enzymaktivität; ebenso wurde bei den Trägern dieser Mutation in unserer Populationsstudie eine nicht statistisch signifikant reduzierte DPD Aktivität gemessen.

Die Messung der einzelnen Mutationen in der Bootstrap Analyse ergab jedoch für zwei Mutationen eine signifikant verringerte DPD Enzymaktivität:

Die Alterationen 1601G>A (Ser534Asn, DPYD*4) sowie 2846A>T (Asp949Val) wurden bereits in früheren Studien von Collie-Duguid et al, 2000, van Kuilenburg et al, 2000 und Lazar et al, 2004, dergestalt betrachtet, dass sie die Integrität des Enzyms beeinflussen und folglich die Aktivität verringern würden. In unserer Analyse waren diese beiden Varianten jedoch nur in diesen Haplotypen vertreten, die mit einer Häufigkeit von unter 1% auftraten. Doch interessanterweise konnte bei der singulären Betrachtung dieser beiden Alterationen im Vergleich von Trägern zu Nicht-Trägern eine signifikant verringerte mittlere DPD Aktivität festgestellt werden.

Die Analyse der weiteren Haplotypen ergab für keinen weiteren außer den bereits beschriebenen eine signifikante Abweichung von der mittleren DPD Aktivität.

Mutation/ Haplotyp	Signifikanz	Mediane Aktivitäts- Differenz	5 % Konfidenz	95 % Konfidenz	Differenz in % vom Durchschnitt	Zahl der gültigen Fälle
Asp949Val	1	-0,0302	-0,0367	-0,0239	-21,1%	2
Ser534Asn	1	-0,0193	-0,0307	-0,0063	-13,5%	4
Met166Val	0	-0,0084	-0,0222	0,0056	-5,9%	21
hap1	0	-0,0002	-0,0333	0,0320	-0,2%	11
hap2	0	0,0039	-0,0179	0,0273	2,7%	11
hap3	1	0,0336	0,0096	0,0672	23,5%	5
hap4	1	-0,0163	-0,0300	-0,0041	-11,4%	3
hap5	0	-0,0004	-0,0248	0,0225	-0,3%	6
hap6	0	0,0079	-0,0249	0,0533	5,5%	5
hap7	0	0,0177	-0,0352	0,0417	12,4%	2
hap8	1	-0,0194	-0,0346	-0,0036	-13,6%	3
hap9	0	0,0031	-0,0145	0,0211	2,2%	2
hap11	0	0,0006	-0,0113	0,0129	0,4%	4
hap12	0	-0,0028	-0,0143	0,0087	-2,0%	5
hap13	1	0,0478	0,0338	0,0809	33,4%	2

Tabelle 7: Einfluss einiger einzelner Sequenz-Alterationen und Haplotypen auf die mediane DPD-Aktivität, evaluiert anhand der Bootstrap-Analyse. Fett gedruckt sind diejenigen Einzelmutationen und Haplotypen, die eine statistisch signifikante Abweichung von der mittleren DPD Aktivität aufzeigen.

5. Zusammenführung von Genetik, Aktivitätsdaten, Strukturdaten und Statistik

a) Polymorphismen: 85T>C (Cys29Arg, DPYD*9A) und 1627A>G (Ile543Val, DPYD*5)

Im Exon 2 zeigte sich die bekannte Mutation 85T>C (DPYD*9A, Cys29Arg) wie erwartet in einer hohen Allel-Frequenz von 19,4%; in der untersuchten Population von 157 Probanden fanden sich 51 Heterozygote und 5 Homozygote. Für die Mutation des Exon 13 1627A>G wurde ebenfalls eine hohe Allel-Frequenz von 14% festgestellt. Bei der Verteilung von Heterozygoten zu Homozygoten konnte ein Verhältnis von 37 zu 3 diagnostiziert werden.

Bei der Betrachtung hinsichtlich Aktivitätswerten und Genetik lassen sich Ergebnisse und Vermutungen früherer Studien und Veröffentlichungen bestätigen:

Die Autoren (Ridge et al, 1998; van Kuilenburg et al, 1998; Johnson et al, 2002) bezeichnen die Varianten 85T>C (Cys29Arg) und 1627A>G (Ile543Val) als Polymorphismen:

In vorliegender Populationsstudie liegen die mittleren Aktivitätswerte sowohl des heterozygoten Genotyps 85T>C als auch 1627A>G bei 0,15 nmol/min/mg Protein bzw. 0,14 nmol/mg/min Protein, was dem Gesamt-Mittelwert von 0,143 nmol/min/mg Protein entspricht. Ebenso lässt sich in beiden Fällen bei homozygoten Trägern keine reduzierte Aktivität feststellen: die fünf Homozygoten von 85T>C und 3 Homozygoten von 1627A>G weisen mittlere Aktivitätswerte von 0,13 nmol/min/mg Protein bzw. 0,14 nmol/min/mg Protein auf. Ebenso zeigen die Haplotypen, die die Alteration 85C beinhalten, keine signifikante Reduktion der mittleren DPD Aktivität; vielmehr geht sogar der Haplotyp 3 mit einer statistisch signifikant erhöhten DPD Aktivität einher.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese beiden Veränderungen 85T>C (Cys29Arg, DPYD*9A) und 1627A>G (Ile543Val, DPYD*5) nicht zu DPD-defizienten Phänotypen führen.

In Übereinstimmung mit diesen Daten ist, dass nach Mattison et al, 2002 beide DPD Sequenzen entlang der Evolution keine Konservierung erfuhren und somit vermutlich keine bedeutende Rolle in der Funktionalität darstellen.

Bei der Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der Schweine-DPD lassen sich die geäußerten Vermutungen bestätigen:

Ebenso wie van Kuilenburg et al, 2002, formuliert hat, zeigte sich im Modell der dreidimensionalen Proteinstruktur im Hinblick auf den Proteinaustausch Cys29Arg, dass kein in der Struktur begründeter Hinweis auf eine veränderte enzymatische Aktivität besteht.

Die gemeinsame Betrachtung der einzelnen Ergebnisse legen somit die Bezeichnung der vorliegenden Varianten als Polymorphismen nahe; es ist keine nachhaltige Beeinträchtigung der Funktion der DPD nachzuweisen und somit trifft eine DPD-Defizienz mit konsekutiver 5-FU-Unverträglichkeit mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einen dieser beiden Genotypen zu.

b) 295-298delTCAT (DPYD*7)

Die im Exon 4 beobachtete Deletion von vier Basenpaaren (295-298delTCAT, DPYD*7) konnte nur bei einem Probanden detektiert werden; diese aus der Literatur bekannte Mutation (van Kuilenburg et al, 1999) führt zu einer Zerstörung der regulären Proteinstruktur der DPD und könnte konsekutiv zu einem, wenn auch partiellen, Verlust der DPD-Funktion im heterozygoten Zustand führen. Leider konnte von diesem Probanden kein Aktivitätstest erhalten werden, so dass keine genaue Aussage über die absolute DPD-Defizienz mithilfe der DPD Aktivität getroffen werden kann. Jedoch lässt sich aufgrund der Zerstörung der regulären Proteinstruktur folgern, dass eine uneingeschränkte Funktion des Enzyms nicht mehr vorhanden sein kann und folglich bei Trägern eines oder beider Allele mit dieser Deletion eine DPD Defizienz und folgende 5-FU-Intoleranz sehr nahe liegend ist.

c) 496A>G (Met166Val)

Die Mutation im Exon 6, 496A>G (Met166Val) zeigte hinsichtlich der Aktivitätswerte eine weite Streuung von 0,08 – 0,21 nmol/min/mg Protein, der Mittelwert befindet sich bei 0,13 nmol/min/mg Protein. In der Literatur wurde diese Mutation von diversen Autoren (Johnson et al, 2002; van Kuilenburg et al, 2000; Ezzeldin et al, 2003; Gross et al 2003) im Zusammenhang mit Patienten, die unter 5-FU-Toxizität litten, beschrieben, was auf eine mögliche Einschränkung der Funktion der DPD hinweisen könnte. Zusätzlich stellt Mattison et al, 2002 fest, dass es sich in diesem Bereich um eine höchst konservierte Region handelt, die infolgedessen eine große Bedeutung in der Proteinfunktion haben könnte. Dem Einfluss der Mutation 496A>G auf die Integrität der DPD widerspricht allerdings Johnson et al, 2002, der diese Variante bei einem Krebspatienten mit uneingeschränkter DPD Aktivität nachweisen konnte; somit stellt er die These auf, dass dieser Genotyp keinen DPD defizienten Phänotyp bewirkt. Dies stände im Einklang mit den im Normbereich liegenden Aktivitätswerten der vorliegenden Untersuchung und ebenfalls mit der Bootstrap Analyse, die bei der singulären Betrachtung keine signifikante Reduzierung der DPD Aktivität nachweisen konnte; jedoch lagen nur Daten von heterozygoten Mutationsträgern vor. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse aus der Strukturanalyse: das Methionin an der Position 166 reicht tief in den inneren Bereich

des Enzyms hinein und ist Teil eines hydrophoben Netzwerks mit van-der-Waals-Kontakten mit anderen Aminosäuren. Falls sich an dieser Position infolge der Mutation ein Valin befindet, entsteht aufgrund dessen kürzerer Seitenkette ein Leerraum in der Mitte dieser Verbindung; dies könnte zur Folge haben, dass wegen des hydrophoben Charakters die Struktur zusammenbricht oder die an dieser van-der-Waals-Interaktion beteiligten Aminosäuren sich in anderer Form zusammenfügen (Gross et al, 2003) und ebenso destabilisierend wirken. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint ein - wenn auch diskreter - Einfluss der Mutation Met166Val auf Verminderung der DPD Funktionalität zu bestehen. Für eine abschließende Betrachtung und Festlegung müssten neben den heterozygoten Trägern dieser Mutation ebenfalls homozygote Träger in die Untersuchung mit einbezogen werden. Es könnte sein, dass die - wenn auch diskret verschlechterte - Funktion des Enzyms bei nur einem alterierten Allel durch das Wildtyp-Allel aufrecht erhalten wird; lägen beide Allele in alterierter Form vor, ist es nicht auszuschließen, dass die DPD-Funktion teilweise beeinträchtigt wäre.

d) 775A>G (Lys259Glu)

Die Mutation 775G>A im Exon 8 trat weder in der Populationsstudie auf, noch war sie in der Literatur bisher beschrieben, sondern zeigte sich nur bei einer Patientin im heterozygoten Zustand. Diese Patientin hatte mit schwerer Mucositis Grad III und starker Verschlechterung des Allgemeinzustandes unter Therapie mit CMF reagiert. Der DPD Aktivitätswert lag allerdings im Normbereich, sowie er von Johnson definiert wird.

Bei Betrachtung der Aminosäureposition im Hinblick auf die Evolution zeigt Mattison et al, 2002, eine Konservierung der Position 259 über 5 Säugetierspezies hinweg; allerdings erfolgte bei *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* ein Austausch des Lysins durch Arginin.

Die Strukturanalyse des Schweineproteins, bei dem ebenfalls wie bei der humanen DPD an Position 259 das Lysin konserviert ist, weist auf eine zumindest partielle Inaktivierung des Enzyms durch den Austausch des Lysins gegen ein Glutamat hin. Das homologe Modell zeigt eine ähnliche Ausrichtung der Variante 259Glu zu 259Lys innerhalb der dreidimensionalen Struktur (siehe Abb. 12). Jedoch ändert sich die Ladung dieses Bereiches: im Fall des Lysins herrscht eine positive Ladung vor,

die durch den Austausch mit Glutamat sich in eine negative Ladung ändert. Dies könnte entscheidende Auswirkungen auf die Strukturordnung haben: die Bindung des FAD an das DPD-Protein könnte an Stärke verlieren, so dass konsekutiv der Wasserstofftransport von dem elektroneutralen Kosubstrat NADPH gestört wäre. Dies liegt darin begründet, dass die negative Ladung des Glutamats möglicherweise eine Abstoßung der hydrophoben β -Faltblattstruktur bewirkt, so dass in einem weiteren Schritt die Bindung zu dem benachbarten FAD gelockert und somit die Bindung von Kofaktoren an FAD gestört wird. Folglich würde die Funktionalität des Enzyms gestört werden und eine Reduzierung der DPD Aktivität bewirken. Jedoch steht dies im Gegensatz zur gemessenen DPD Aktivität der vorliegenden Patientin: der gemessene Wert von 0,13nmol/min/mg Protein läge anhand der definierten Referenzbereiche im oberen Normbereich.

Für diese Diskrepanz der Daten lassen sich zwei Erklärungen versuchen.

Zum einen weist diese Patientin nur ein mutiertes Allel auf, so dass das intakte zweite Allel für die Funktion des Enzyms unter normalen Bedingungen ausreichen und normale Aktivitätswerte bewirken könnte. Da das eine Allel die regelrechte Kodierung bewirkt, würde folglich erst unter Belastung – Gabe von 5-FU – die Funktion des Enzyms nicht mehr ausreichen, um die toxischen Substrate ausreichend zu katalysieren.

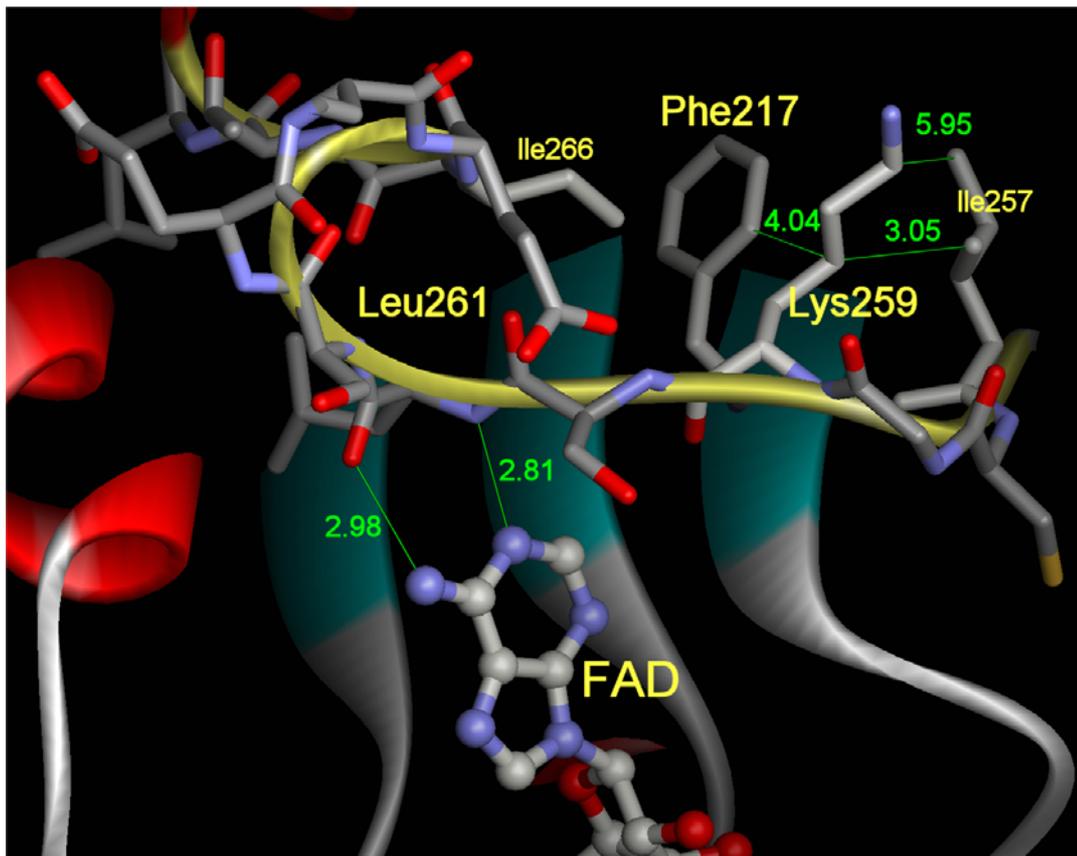


Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur des Bereichs um Lys259

Des Weiteren sind die definierten Normbereiche der DPD Aktivität zu diskutieren. Diese wurden in unabhängigen Untersuchungen definiert und beschreiben annähernd denselben Referenzbereich. Jedoch können die Werte dieser Untersuchungen nicht uneingeschränkt auf die vorliegenden Aktivitätswerte angewandt werden; jede Messung kann einen systematischen Fehler beinhalten, so dass die absoluten relativen Unterschiede zwar übereinstimmen, die absoluten Werte jedoch differieren können. Somit muss man bei dem Aktivitätswert der vorliegenden Patientin, der per definitionem im Referenzbereich liegt, bedenken, dass die Messungen nicht innerhalb desselben Systems durchgeführt worden sind und somit nur eingeschränkt vergleichbar sind.

e) 1218G>A (Met406Ile), 1236G>A (Glu412Glu)

Diese beiden Mutationen im Exon 11 waren bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Sie traten in der Normalpopulation in geringem Prozentsatz von

1% bzw. 0,3% auf, keine der untersuchten Patientinnen wies eine der beiden Alterationen auf.

Der Basenaustausch 1218G>A mit folgendem Aminosäuretausch von Methionin zu Isoleucin trat nur bei drei Individuen auf: bei einer Normalperson lag diese Alteration gleichzeitig mit der Deletion im Exon 4 vor; bei dieser Person gibt es keine Messung der DPD Aktivität. Des Weiteren lässt sich diese Variante zusammen mit einer Variante im Exon 23 feststellen, der Aktivitätswert dieser Normalperson liegt bei 0,14nmol/min/mg Protein, was im Normbereich liegt. Bei dem dritten Probanden mit dieser Variante liegt gleichzeitig der Polymorphismus 1627A>G im Exon 13 und homozygot der Polymorphismus 85T>C im Exon 2 vor; der gemessene DPD Aktivitätswert liegt bei 0,19 nmol/min/mg Protein.

Eine Analyse der dreidimensionalen Struktur bei diesem Aminosäureaustausch bringt keine weiteren Ergebnisse, da das Codon 406 an der Oberfläche des Enzyms liegt und nicht konserviert ist. Der Vergleich dieser Normalpersonen und der vorliegenden Aktivitätswerte lässt die Vermutung äußern, dass es sich bei der Alteration 1218G>A (Met406Ile) um eine nicht die Funktion beeinträchtigende Variante handelt.

Die Alteration 1236G>A, die einen synonymen Aminosäure-Austausch nach sich zieht (Glu412Glu), trat nur bei einer der untersuchten Normalpersonen auf. Da kein Austausch der Aminosäuren im Protein entsteht, ist keine Veränderung der Funktionalität zu erwarten, so dass keine weiteren Untersuchungen wie DPD-Aktivitätswert und Strukturanalyse durchgeführt wurden.

f) 1601G>A (Ser534Asn, DPYD*4)

Diese Mutation trat in der Normalpopulation nur heterozygot und mit einer Allel-Frequenz von 1,6% auf; bei den untersuchten Patientinnen mit Fluoropyrimidin-Unverträglichkeit war die Allel-Frequenz mit 25% bedeutend höher. Die mittlere DPD-Aktivität der Probanden mit vorliegender Mutation lag bei 0,12nmol/min/mg Protein, was nach Johnson et al im mittleren Referenzbereich liegt. Dieser Mittelwert ist im Vergleich zum Mittelwert aller untersuchten Probanden, der bei 0,14nmol/min/mg Protein liegt, etwas reduziert. Des Weiteren zeigten zwei der Probanden eine geringere Aktivität von 0,11nmol/min/mg Protein, was zwar noch im Referenzbereich liegt, aber deutlich geringer ist als der Median der Normalpopulation.

Betrachtet man die dreidimensionale Struktur des Proteins in Hinblick auf den Aminosäureaustausch von Serin in Asparagin, so ist eine strukturelle Veränderung denkbar: die hochkonservierte Position des Ser534 ist in einer β -Hairpin-Loop lokalisiert, die als Teil der Domäne IV der DPD mit einer aktiven Seite einer FMN-Bindungsdomäne interagiert. Durch den Austausch des Serins in Asparagin könnte eine Dislokation der β -Faltblatt-Struktur stattfinden, wodurch die Bindungsdomäne für FMN gestört würde. Folglich könnte sich die Funktionalität des Enzyms und dadurch die DPD Aktivität verändern.

In der Bootstrap Analyse wurde der Einfluss dieser Mutation auf die mediane DPD Aktivität singular betrachtet, da die betroffenen Haplotypen eine zu geringe Häufigkeit haben; es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Aktivität um 13,5%. Dies bedeutet, dass bei Vorliegen dieser Mutation sogar im heterozygoten Fall von einer leicht reduzierten DPD Aktivität ausgegangen werden kann. Diese Daten bestärken die Aussagen von Collie-Duguid et al, 2000, und Lazar et al, 2004, dass die Mutation DPYD*4 phänotypisch eine DPD Funktionseinschränkung bewirken könnte. Eine endgültige Aussage über die Wertigkeit dieser Mutation und die Bestätigung des klinischen Einflusses setzt jedoch eine detaillierte Analyse von homozygoten Genotypen voraus.

g) 1896T>C (Phe632Phe)

Bei dieser Variante handelt sich um eine bei 4% der untersuchten Population auftretende stille Mutation. Das native Protein ist nicht verändert, da sowohl beim Wildtyp als auch beim vorliegenden Basenaustausch die Aminosäure Phenylalanin kodiert wird. Somit ist eine Beeinträchtigung des Enzyms durch diese Variante ausgeschlossen. Die DPD-Aktivitätswerte der Probanden mit vorliegender Mutation liegen alle im Referenzbereich, der Mittelwert spricht mit 0,14 nmol/min/mg Protein für eine ungestörte DPD-Funktion.

h) 2194G>A (Val732Ile, DPYD*6)

Bei vorliegender Mutation, die in der untersuchten Population mit einer Häufigkeit von 2% auftritt, lässt sich keine statistisch signifikant reduzierte DPD-Aktivität nachweisen. Die mediane Aktivität trifft genau den Median der gesamten Population

(0,14nmol/min/mg Protein). Keine der Unverträglichkeit zeigenden Patientinnen zeigte diese Variante. Bisher wurde weiterhin in der Literatur noch kein Fall mit dieser Mutation beschrieben, der ein defizientes Enzym oder Toxizitätserscheinungen auf Fluoropyrimidine gezeigt hatte. Zusätzlich wurde diese Region im Laufe der Evolution nicht konserviert, was ebenfalls gegen eine Bedeutung für die Funktionalität der DPD spricht.

Strukturanalytisch wurde diese Region bisher nicht untersucht, was weitere Informationen zu dieser Alteration geben würde. Bisher ist eher von einem selten auftretenden Polymorphismus auszugehen, der keinen signifikanten Einfluss auf die Funktion der Dihydropyrimidindehydrogenase bewirkt. Jedoch muss diese Vermutung durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

i) 2846A>T (Asp949Val)

Diese Mutation im Exon 22 trat in einer geringen Frequenz von 0,6% in der untersuchten Population auf, so dass sie nicht in den häufigen Haplotypen begegnete. In vorangegangenen Untersuchungen von Ezzeldin et al, 2003, und van Kuilenburg et al, 2000, wurde diese Mutation mit einer verringerten DPD Aktivität in Verbindung gebracht. In unserer Studie zeigte sich ebenfalls eine im Vergleich zum Median (0,14nmol/min/mg Protein) verringerte Aktivität von 0,11nmol/min/mg Protein bei beiden Probanden mit dieser Mutation. Dieser Effekt auf die Aktivität ist in der Bootstrap Analyse signifikant. Daraus ergibt sich zwar ein mäßiger, jedoch signifikanter Einfluss des Aminosäureaustausches von Aspartat in Valin auf die Funktion der DPD.

Die evolutionär hoch konservierte Position Asp949 ist an der Vermittlung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, welche für den Elektronentransport über die C-terminalen Eisen-Schwefel-Cluster des Enzyms wichtig ist. Somit sollte diese Position eine wichtige Rolle im Elektronentransfer während der katalytischen Reaktion der DPD spielen, wie van Kuilenburg et al, 2002, angenommen. Dies spricht für die nötigen Erhalt des Asparagins für die Funktionalität des Enzyms, da beim Verlust der Wasserstoffbrückenbindung die Cluster-Formation gestört würde.

In den untersuchten Patientinnen trat diese Mutation nicht auf, jedoch berichtet Ezzeldin et al, 2003, von Patienten mit schwerer 5-FU-Unverträglichkeitsreaktion, sogar in einem Fall mit letalem Ausgang. Dieser hatte jedoch zusätzlich

die Mutation Met166Val und den Polymorphismus Ile543Val, sowie die Splice Mutation IVS14+1g>a, so dass nicht nur Asp949Val für die DPD Insuffizienz verantwortlich gewesen sein kann. In unserer untersuchten Population trat Asp949Val nur in Verbindung mit Met166Val bei einem Probanden sowie mit dem Polymorphismus Ile543Val auf. In diesen Kombinationen ist davon auszugehen, dass die leichte Reduzierung der DPD Aktivität allein durch Asp949Val ausgelöst wird, da die beiden anderen Varianten keinen signifikanten Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms haben.

Auch in diesen Fall muss wie bei der Mutation im Exon 13 Ser534Asn eine detaillierte Untersuchung von homozygoten Individuen erfolgen, um eine endgültige Aussage über die klinische Relevanz dieser Mutation treffen zu können.

j) 3067C>T (Pro1023Ser)

Diese Mutation trat in der Normalpopulation zum ersten Mal auf, war bisher nicht in der Literatur beschrieben worden. Allerdings wurden nur eine Normalperson und kein Patient mit dieser Alteration gefunden, was einer Allel-Häufigkeit von 0,3% in der untersuchten Population entspricht. Die DPD Aktivität des Mutationsträgers entspricht dem Median der gesamten Population von 0,14nmol/min/mg Protein. Diese Person zeigte weiterhin die neu entdeckte Mutation Met406Ile, die jedoch als Normvariante interpretiert wird.

Insgesamt sprechen die Aktivitätsdaten eher dafür, dass man von einer harmlosen Variante sprechen kann, die keinen Einfluss auf die Funktion des Enzyms haben sollte.

Eine strukturelle Untersuchung ist bisher nicht möglich, da der C-Terminus, der diese Mutation beinhaltet, in der Kristallstruktur aufgrund seiner Flexibilität bisher nicht auflösbar ist und die DPD-Struktur des Schweins nur bis zur Aminosäure-Position 1017 gesichert ist.

VI. Zusammenfassung

Mithilfe der denaturierenden HPLC wurde eine Mutationsanalyse des gesamten kodierenden Abschnitts des DPYD-Gens durchgeführt.

Für jedes Exon und teilweise für einzelne Fragmente eines Exons wurden die optimale DHPLC-Temperatur und der Elutionsgradient anhand von Berechnung sowie experimentell ermittelt, so dass durch das jeweilige Chromatogramm eine definitive Zuordnung zu Wildtyp oder zu spezifischen bekannten Mutanten möglich wurde; stichprobenartige Kontrollen bestätigten in der Sequenzierung den erwarteten Genotyp. Somit wurde die Sequenzierung nur bei neuen oder unklaren Chromatogrammen bzw. Genotypen nötig.

Ebenso konnte nach Evaluierung der exakten Analysenbedingungen mittels der optimierten DHPLC ein zeitlich wenig aufwendiges Screening einer großen Probandengruppe durchgeführt werden: bei einer durchschnittlichen Analysendauer von 6-8 min pro Einzelprobe und automatischer Probenapplikation konnten innerhalb relativ kurzer Zeit große Probenmengen bewältigt werden.

Die Mutationsanalyse der Normalpopulation zeigt eine Vielfalt an Mutationen: sowohl im kodierenden als auch in Intron-Abschnitten des DPYD-Gens konnten insgesamt 23 Variationen identifiziert werden, davon drei bisher unbekannte Varianten. Im Patientenkollektiv konnte zusätzlich eine bisher nicht beschriebene Mutation entdeckt werden.

Zur Klärung, welche der Mutationen für eine herabgesetzte Enzymaktivität und konsekutiv für DPD-Defizienz verantwortlich ist, wurden die genetischen Daten mit funktionellen Daten in Korrelation gesetzt:

Zusammen mit DPD-Aktivitätswerten, Daten zur dreidimensionalen Proteinstruktur und statistischer Analyse konnten einige Mutationen als harmlose Polymorphismen beurteilt werden, während hingegen einige Mutationen der weiteren Untersuchung bedürfen. Schließlich lassen sich einige wenige Mutationen tendenziell als funktionsbeeinträchtigende bezeichnen:

Die in der Literatur beschriebene Intron 14 Splice-Mutation trat in unserem Kollektiv nicht auf; jedoch lässt sich eine Funktionseinschränkung erklären: das Exon 14 wird herausgespleißt, somit fehlt die durch das Exon 14 kodierte Uracilbindestelle.

In unserem Kollektiv trat die Mutation im Exon 4 auf, die hinlänglich aus der Literatur bekannt durch Wegfall dreier Basen ein verschobenes Leseraster bewirkt und folglich ebenso ein in der Funktionalität gestörtes Protein produziert.

Durch die Korrelation mit der funktionellen Diagnostik lassen sich zwei Mutationen mit statistischer Signifikanz einer herabgesetzten Enzymaktivität zuordnen: 2846A>T (Asp949Val) und 1601G>A (DPYD*4, Ser534Asn); ebenfalls bei Betrachtung der Analyse der dreidimensionalen Struktur erhärtet sich der Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Enzymfunktion bei vorliegenden Mutationen.

Unsere Untersuchung an der Normalpopulation bestätigt frühere Studien, die eine Inzidenz von 1-3% von genetischen DPD-Defekten beschreiben. Deshalb ist das Risiko des Individuums, unter Chemotherapie mit Fluoropyrimidin-haltigen Substanzen eine schwere toxische Reaktion zu erleiden, zwar gering, jedoch nicht zu vernachlässigen. Somit ist ein prätherapeutisches Screening auf genetische Defekte mittels schneller und wenig zeit- und kostenintensiver Methoden indiziert: die Möglichkeit der DHPLC wäre diesem Zweck entsprechend. Jedoch bis zur endgültigen Differenzierung von harmlosen Polymorphismen und therapielevanten Mutationen sind weitere Untersuchungen nötig: anschließend an die Analyse der Normalpopulation wurde mit einer Studie an einem Patientenkollektiv begonnen.

VII. Literaturverzeichnis

1. Blum JL. The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer. *Oncologist* 2001; 6:56-64.
2. Collie-Duguid ESR, Etienne MC, Milano G, Mcleod HL. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 2000;10:217-23.
3. Diasio RB, Johnson MR. The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5-fluorouracil. *Pharmacology* 2000;61:199-203.
4. Diasio RB. Oral DPD-inhibitory fluoropyrimidine drugs. *Oncology (Huntingt)* 2000;14:19-23.
5. Ding K, Zhou K, He F, Shen Y. LDA – a java-based linkage disequilibrium analyzer. *Bioinformatics*.2003 Nov 1;19:2147-2148.
6. Dobritsch D, Ricagno S, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y. Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with NADPH and 5-iodouracil - Implications for mechanism of inhibition and electron transfer. *J Biol Chem* 2002;277:13155-66.
7. Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N . Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 1995;13:1663-70.
8. Ezzeldin H, Johnson MR, Okamoto Y, Diasio R. Denaturing high performance liquid chromatography analysis of the DPYD gene in patients with lethal 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res* 2003;9:3021-8.

9. Fleming RA, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renee N, Schneider M, Demard F. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* 1992;52:2899-902.
10. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999;105:72-78.
11. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific BRCA 1 and BRCA 2 variants by DHPLC. *Hum Mut.* 2000;16:345-53.
12. Gross E, Kiechle M, Arnold N. Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 47:73-81.
13. Gross E, Seck K, Neubauer S, Mayr J, Hellebrand H, Ratanaphan A, Lutz V, Stockinger H, Kiechle M. High-throughput genotyping by DHPLC of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene implicated in (fluoro)pyrimidine catabolism. *Int J Oncol* 2003;22:325-32.
14. Gross E, Ullrich T, Seck K, Mueller V, de Wit M, von Schilling C, Meindl A, Schmitt M, Kiechle M. Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Hum Mutat* 2003;22:498.
15. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987;47:2203-6.
16. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*; 1988;16(15):7351-7367.

17. Johnson MR, Yan J, Shao L, Albin N, Diasio RB. Semi-automated radioassay for determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. Screening cancer patients for DPD deficiency, a condition associated with 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;696:183-91.
18. Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase- deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999;5:2006-11.
19. Johnson MR, Wang K, Diasio RB. Profound dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency resulting from a novel compound heterozygote genotype. *Clin Cancer Res* 2002;8:768-74.
20. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clinical Chemistry* 1999;45:1133-40.
21. Lazar A, Mau-Holzmann UA, Kolb H, Reichenmiller HE, Riess O, Schomig E. Multiple organ failure due to 5-fluorouracil chemotherapy in a patient with a rare dihydropyrimidine dehydrogenase gene variant. *Onkologie*. 2004;27:559-62.
22. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997;15:110-5.
23. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5- fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res* 1993;53:5433-8.

24. Lu Z, Zhang R, Diasio R. Comparison of dihydropyrimidine dehydrogenase from human, rat, pig and cow liver. Biochemical and immunological properties. *Biochem Pharmacol* 1993;46:945-952.
25. Mattison LK, Johnson MR, Diasio RB. A comparative analysis of translated dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA; conservation of functional domains and relevance to genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2002;12:133-44.
26. Milano G, Etienne MC. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and clinical pharmacology of 5-fluorouracil (review). *Anticancer Res* 1994;14:2295-7.
27. Nickerson ML, Weirich G, Zbar B, Schmidt LS. Signature-based analysis of MET proto-oncogene mutations using DHPLC. *Hum Mut.* 2000;16:68-76.
28. Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 57: (suppl A266), 1995.
29. Oefner PJ, Underhill PA. DNA mutation detection using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Current protocols in Human Genetics*, Wiley and Sons, New York, Supplement 19,7.10,1-7.10,12,1998.
30. Raida M, Schwabe W, Hausler P, van Kuilenburg ABP, Van Gennip AH, Behnke D, Hoffken K. Prevalence of a common point mutation in the Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001;7:2832-9.
31. Ridge SA, Sludden J, Brown O, Robertson L, Wei X, Sapone A, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, Vreken P, van Kuilenburg ABP, van Gennip AH, McLeod HL.

- Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects. *Brit J Clin Pharmacol* 1998;46:151-6.
32. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:6230-6234.
 33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977;74(12):5463-5467.
 34. Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S, Borner M, Burns WI, Burris HA. Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol* 2003;14:1735-43.
 35. Seck K, Riemer S, Kates R, Ullrich, Lutz V, Harbeck N, Schmitt M, Kiechle M, Diasio R, Gross E. Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5886-5892.
 36. Shestopal SA, Johnson MR, Diasio RB. Molecular cloning and characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase promoter. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494:162-9.
 37. Takimoto CH, Lu Z, Zhang R, Liang MD, Larson LV, Cantilen LR, Grem JL, Allegra CJ, Diasio R, Chu E. Severe neurotoxicity following 5-fluorouracil-based chemotherapy in a patient with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Cancer Res* 1996;2:477-481
 38. van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, Meinsma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, Van Gennip AH. Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice donor site of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity. *Eur J Cancer* 1997;33:2258-64.

39. van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, De Abreu RA, Van Gennip AH. Severe 5-fluorouracil toxicity caused by reduced dihydropyrimidine dehydrogenase activity due to heterozygosity for a G -> A point mutation (vol 21, pg 280, 1998). *J Inher Metabol Dis* 1998;21:783.
40. van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NGGM, Bakker HD, Meinsma R, Van Lenthe H, de Abreu RA, Smeitink JAM, Kayserili H, Apak MY, Christensen E, Holopainen I, Pulkki K, Riva D, Botteon G, Holme E, Tulinius M, Kleijer WJ, Beemer FA, Duran M. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Human Genetics* 1999;104:1-9.
41. van Kuilenburg ABP, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, Maring JG, Vreken P, van Gennip AH. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000;6:4705-12.
42. van Kuilenburg ABP, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJM, Maropoulos GD, Hein G, Kalhoff H, Kirk JM, Baaske H, Aukett A, Duley JA, Ward KP, Lindqvist Y, van Gennip AH. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J* 2002;364:157-63.
43. van Kuilenburg ABP, De Abreu RA, Van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem* 2003;40:41-5.
44. von Minckwitz G (Hrsg.). Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome. AGO State of the Art Version 2005.

45. Wei X, Mcleod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 1996;98:610-5.
46. Weir B. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer, 1996; Massachusetts.
47. Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, Lin K, McBride OW, Podschun B, Schnackerz KD, Gonzalez FJ. cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 1994;269:23192-6.
48. Zhao LP, Li SS, Khalid N. A method for the assessment of disease associations with single-nucleotide polymorphism haplotypes and environmental variables in case-control studies. *Am J Hum Gent* 2003;72(5):1231-50.

Verwendete Websites:

http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

<http://insertion.stanford.edu/melt.html>

www.chgb.org.cn/lda/lda.htm

www.accelrys.com

www.dpdenzyme.com

VIII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Stoffwechselweg der Fluoropyrimidine: 85% des 5-FUs werden durch die DPD in inaktive Metabolite katabolisiert; nur 15% wirken auf dem anabolen Weg durch den Einbau in RNA und DNA sowie durch Hemmung der Thymidilat-Synthase. S. 6
- Abb. 2:** Gen-Struktur des DPYD-Gens: es besteht aus 23 Exons und den Dazugehörigen Intronabschnitten auf einer Länge von 150 kb S. 7
- Abb. 3:** dreidimensionale Struktur der Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) des Schweins S. 7
- Abb. 4:** Darstellung der Doppelstrang-Varianten und Chromatogramme nach dem De- und Renaturierungsprozess auf der DHPLC beim Wildtyp und einem heterozygoten Genotypen S. 19
- Abb. 5:** Temperatur-abhängige Unterscheidung der Heteroduplex- von Homoduplexmolekülen S. 20
- Abb. 6a:** Reaktionsansatz zur Reinigung des PCR-Produkts zur Sequenzierung S. 23
b: das verwendete Sequenzierprogramm
- Abb. 7:** Darstellung eines sauberen PCR-Produktes anhand eines klaren Einzel-Peaks im Chromatogramm unter nicht denaturierenden Bedingungen S. 26
- Abb. 8:** Chromatogramm des Exon 13 bei unterschiedlichen Temperaturen – Unterscheidung der verschiedenen Genotypen anhand der spezifischen Chromatogramme S. 28
- Abb. 9:** Darstellung der Chromatogramme des Exons 2, 8 und 14 im Wildtyp sowie der spezifischen Mutationen S. 29

Abb. 10: Paarweise Messungen von D' und r^2 des Linkage Disequilibrium mithilfe des Programms LDA S. 37

Abb. 11: Verteilung der DPD-Aktivitätswerte annähernd an eine Gauss'sche Kurve S. 40

Abb. 12: Dreidimensionale Struktur der DPD im Bereich des Lys259 S. 48

2. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Primerpaare der 23 Exons und die Länge der Exons im Basenpaaren S. 17

Tab.2: PCR-Programm, das grundsätzlich für die meisten Exons zur Amplifizierung verwendet wurde S. 17

Tab.3: DPYD-Mutationen der 157 Normalpersonen; Häufigkeiten der mutierten Allele und der Schätzungen im Zusammenhang mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium S. 31

Tab.4: Übersicht der bei den Patientinnen festgestellten Varianten und deren DPD-Aktivitätswerte S. 35

Tab.5: Die 15 häufigen Haplotypen, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftreten. Die 23 Loci sind in 5' nach 3' Reihenfolge aufgelistet analog Tabelle 3. Die variable Position ist jeweils fett dargestellt. S. 36

Tab.6: Darstellung einzelner Mutationen und Mutationskombinationen und deren medianer DPD-Aktivitätswert S. 40

Tab.7: Einfluss einiger einzelner Sequenz-Alterationen und Haplotypen auf die mediane DPD-Aktivität, evaluiert mittels Bootstrap-Analyse S. 43

IX. Lebenslauf und Danksagung

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name: Katharina Maria Seck
Geburtsdatum: 23.11.1978
Geburtsort: München
Adresse: Feilitzschstr.31, 80802 München

SCHULAUSSBILDUNG

09/1985 – 09/1989 Grundschole Unterwössen
09/1989 – 09/1996 Staatliches Landschulheim Marquartstein
09/1996 – 06/1998 Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim, Abschluss: Abitur

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN

10/1998 – 09/2000 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
10/2000 – 10/2004 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
11/2004 Studienabschluss und Erlangung der ärztlichen Approbation

Praktisches Jahr:

10/2003 – 02/2004 IV. Medizinische Abteilung (Rheumatologie und Immunologie) im Krankenhaus München Bogenhausen
02/2004 – 05/2004 Chirurgische Abteilung im Krankenhaus München Bogenhausen
06/2004 – 09/2004 Frauenklinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

PRAKTISCHE BERUFSAUSSBILDUNG

Seit 01/2005 Beginn der Facharztausbildung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

AUSSERUNIVERSITÄRE MEDIZINISCHE BERUFSERFABUNG

11/1998 – 10/2003 Tätigkeit als Praxishilfe in der Allgemeinarztpraxis Dr. Pongratz, München
11/2002 – 05/2003 Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Zentrum für naturheilkundliche Forschung der II. Medizinischen Abteilung der Technischen Universität München

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Dissertation Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München bei Dr. E. Gross / Prof. Dr. M. Kiechle

Publikationen

Zentralblatt für Gynäkologie 2002 Dec;124(12):574-9: Mutationen im Dihydropyrimidindehydrogenase-Gen als Ursache von 5-Fluorouracil-Intoleranz.

Human Mutation 2003 Dec;22(6):498: Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects.

International Journal of Oncology 2003 Feb;22(2):325-32: High-through output genotyping of the dihydropyrimidine gene implicated in (fluoro)pyrimidine catabolism by DHPLC.

Clinical Cancer Research 2005, 11(16) August 15, 2005:5886-5892: Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals.

Kongressbeteiligungen / Poster

06/2002 European Human Genetics Conference der ESHG (European Society of Human Genetics), Strasbourg: Detection of 5FU-related variants in the DPYD gene by denaturing HPLC.

09/2002 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Düsseldorf: Genetische Analyse des DPYD-Gens zur Abklärung von 5-FU-Intoleranz. Prämierung als bestes Poster des Bereiches Molekulare/experimentelle Onkologie

06/2004 European Human Genetics Conference der ESHG, München: Complete analysis of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a control cohort of Caucasian individuals.

11/2005 Deutsche Gesellschaft für Perinatalmedizin, Berlin: Habituelle Aborte; Ein Fallbericht und Therapie- bzw. Präventionsstrategien

Vorträge:

01/2002 Mutation analysis of the DPYD gene of a certain population and some patients with toxic reactions under 5-FU-chemotherapy; correlation between geno- and phenotype. (Klinische Forschungsgruppe in der Frauenklinik der Technischen Universität München)

02/2003 Genotyping of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD). (Klinische Forschungsgruppe in der Frauenklinik der Technischen Universität München)

SPRACHKENNTNISSE

Latein (großes Latinum)

Englisch (verhandlungssicher)

Französisch (fließend in Schrift und Sprache)

Danksagung:

Prof. M. Kiechle

Dr. E. Groß

Prof. A. Meindl

Steffi Neubauer, Heide Hellebrand

Fa. Roche

Prof. R. Diasio

Dr. E. Hauenstein

Prof. R. Kates

Prof. P. Pharaoh, Dr. B. Kuschel

G. Kieback, N. Brinker, J. Lastin

G. Pannecke

Meiner Familie