



Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) Exon 14-Skipping Mutationsnachweis zur Toxizitätsrisiko-Abschätzung unter 5-Fluorouracil (5-FU) Therapie

Ab sofort bietet das ZIMCL die Genotypisierung der DPD Exon14-Skipping Mutation (OMIM-ID *612779, #274270) und somit eine Untersuchung zur Abschätzung des 5-Fluorouracil (5-FU) vermittelten Toxizitätsrisikos mittels gelbasierter PCR mit integrierter Sondenhybridisierung an.

KURZINFO

Bedeutung von DPD:

Beim Abbau der Pyrimidin-Basen Uracil und Thymin stellt der durch DPD katalysierte Schritt die erste und geschwindigkeitsbestimmende Reaktion dar. Genetische Varianten im DPD-Gen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen einer Chemotherapie mit 5-FU.

Rolle von DPD im 5-FU-Metabolismus und Bedeutung der Exon14 Skipping-Mutation:

Ca. 80% der verabreichten 5-FU-Dosis wird über DPD verstoffwechselt. Polymorphismen im DPD-Gen können mit einer reduzierten DPD-Aktivität und einem in der Folge reduzierten Abbau von 5-FU einhergehen. Die häufigste Variante, die sog. Exon14 Skipping Mutation (rs3918290, Genotyp *2A), tritt in heterozygoter Form bei ca. 1-2% der Kaukasier auf (Prävalenz der Homozygotie ca. 1:10000) und ist in knapp der Hälfte aller Fälle molekulare Ursache eines DPD-Mangels. Durch einen Austausch von Guanin nach Adenin wird das Exon 14 im Rahmen der mRNA-Prozessierung übersprungen, was zu einem inaktiven Enzym führt. In mehreren Studien konnte diese Mutation bei Patienten mit toxischen Nebenwirkungen unter 5-FU-Therapie nachgewiesen werden. Bei Verabreichung von Standarddosierungen kann es bei Trägern zu einer Akkumulation von 5-FU und dadurch ausgeprägten toxischen Nebenwirkungen (Myelosuppression, Kardiotoxizität, neurologische Störungen, etc.) kommen.

Indikation der DPD-Genotypisierung:

Von der Arbeitsgemeinschaft Internistischer Onkologen (AIO) wird empfohlen, alle Patienten vor Beginn einer 5-FU-Therapie hinsichtlich des Vorliegens einer DPD Exon-14-Skipping-Mutation zu untersuchen.¹ Zudem wird in der Literatur empfohlen, bei heterozygotem Vorliegen der Mutation die 5-FU-Dosierung entsprechend anzupassen bzw. bei Homozygotie von einer Therapie mit 5-FU abzusehen (siehe Tab.1, Seite 4):²

Anforderung der DPD-Genotypisierung: Benötigt werden 3ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist keine Einverständniserklärung erforderlich. Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „DPD-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „DPD-Genotypisierung“ anfordern. Dauer der Untersuchung: max. 1 Woche nach Probeneingang.

Bedeutung der DPD im 5-FU-Metabolismus:

DPD ist ein Pyrimidin-katabolisierendes Enzym und verantwortlich für den initialen und Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt im Uracil- und Thymidin-Katabolismus. Das dafür kodierende DPD-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert (1p22). Zwei Transkript-Varianten, die für verschiedene Enzym-Isoformen kodieren, sind bekannt.

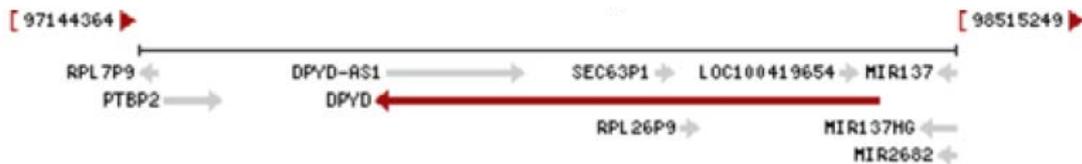
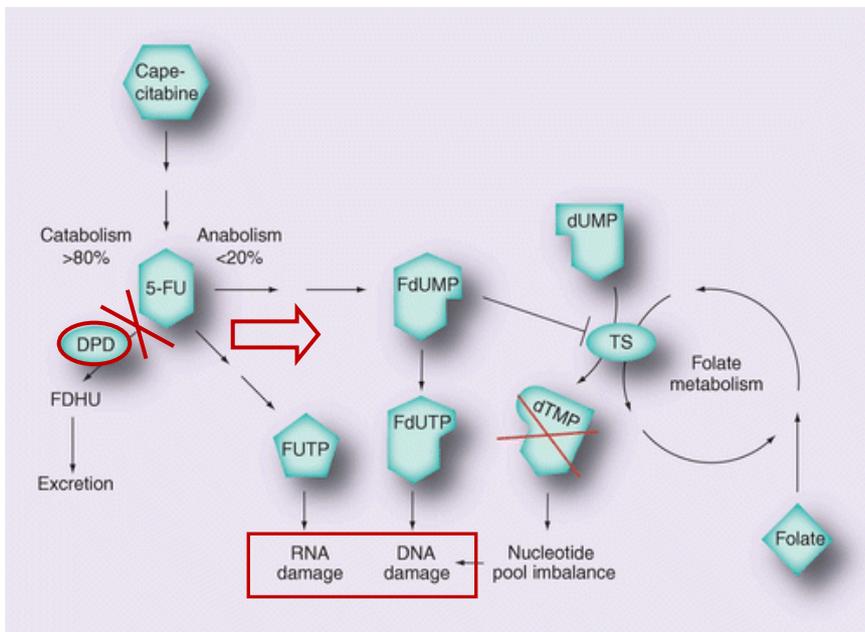


Abb.1: DPD-Gen auf Chromosom 1p22. (Quelle: NCBI, Gene-Database)

5-FU und dessen orale Prodrug Capecitabin sind zwei der am häufigsten verschriebenen Chemotherapeutika für die kurative und palliative Therapie von Patienten mit Tumoren des Gastrointestinal-Trakts, der Mamma sowie Tumoren im Hals- und Kopfbereich. Ca. 80% der verabreichten 5-FU-Dosis wird in der Leber über DPD zu β -Alanin verstoffwechselt, weshalb die Aktivität dieses Enzyms ausschlaggebend für die Toxizität einer 5-FU-Therapie ist.

Abb.2: Schema des 5-FU und Capecitabin (=5-FU Prodrug) Metabolismus und Wirkmechanismus:



Capecitabin wird in 5-FU umgewandelt. Nicht abgebautes 5-FU übt auf Nucleotid-Ebene seinen zytotoxischen Effekt durch Einbau in nukleäre und zytoplasmatische RNA und DNA sowie durch Hemmung des Nucleotid synthetisierenden Enzym Thymidilat Synthase (TS) aus.

(5-FU: 5-Fluorouracil; DPD: Dihydropyrimidin Dehydrogenase; dTMP: Deoxythymidinmonophosphat; dUMP: Deoxyuridinmonophosphat; FDHU: Fluorodihydrouracil; FdUMP: Fluorodeoxyuridinmonophosphat; FUTP: Fluorouridintriphosphat; TS: Thymidylat Synthase.)³

Polymorphismen im DPD-Gen:

Varianten im DPD-Gen können eine Dihydropyrimidin Dehydrogenase Defizienz verursachen, welche zu einem Erliegen des Pyrimidin Metabolismus führt und mit einem erhöhten Toxizitäts-Risiko bei Tumor-Patienten unter 5-Fluorouracil Chemotherapie assoziiert ist.

Ein gesteigerter Medikamenten-Plasmaspiegel infolge verminderten Abbaus kann daher bei Verabreichung von Standarddosierungen so zu einer Akkumulation von 5-FU und dadurch ausgeprägten toxischen Nebenwirkungen führen. Dies kann eine Dosis-Anpassung resp. Therapieumstellung notwendig machen. In einer Studie konnte bei 39-59% aller Patienten, bei denen unter 5-FU-Therapie toxische Nebenwirkungen auftraten, eine verminderte DPD-Aktivität nachgewiesen werden. Während 55% der Patienten mit verminderter DPD-Aktivität eine Grad-IV Neutropenie entwickelten, war dies nur bei 13% der Patienten mit normaler DPD-Aktivität der Fall.⁴

Pharmakogenetische Bedeutung des DPD Exon 14-Polymorphismus

Nach heutigem Wissensstand sind mehrere Polymorphismen im DPD-Gen beschrieben, welche mit einem reduzierten Abbau von 5-FU einher gehen. Die Exon14 Skipping Mutation (rs3918290, Genotyp *2A) ist hierbei die am häufigsten auftretende, funktionell wirksame Variante (Prävalenz 1.5% der Kaukasier, Homozygotie 1:10⁴) und für 40% der genetisch bedingten DPD-Defekte ursächlich. Diese Mutation konnte in mehreren Studien bei Patienten mit toxischen Nebenwirkungen unter 5-FU-Therapie nachgewiesen werden.⁵ Daneben sind noch andere DPD-Varianten in den Exons 2, 4, 6, 7, 13, 21 und 23 beschrieben, die zu einem DPD-Mangel führen können. Die jeweiligen Prävalenzen dieser einzelnen SNPs für sich sind jedoch nur sehr gering, weshalb diese Varianten für ein Screening nicht geeignet sind.

Die Exon14 Skipping Mutation ist bedingt durch den Austausch von Guanin nach Adenin in der konservierten Splice-Donor-Sequenz von Exon 14. Dieser Polymorphismus führt zu einem Überspringen des Exon 14 im Rahmen des prä-mRNA-Splicing und in der Folge zu einem inaktiven Enzym.

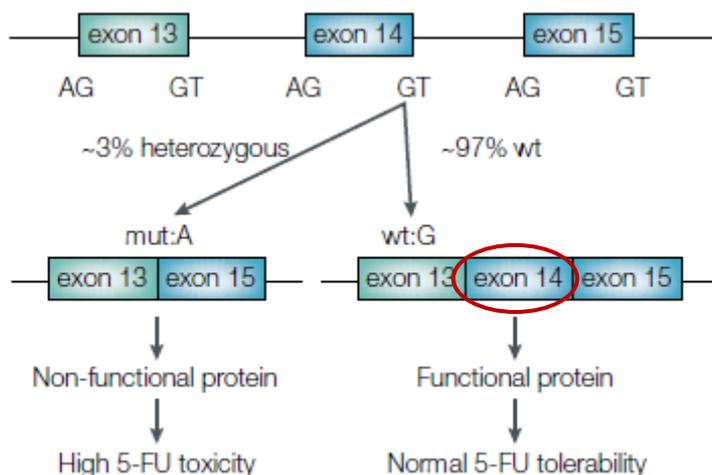


Abb.3: Pathomechanismus der DPD Exon14 Skipping Mutation⁶

Nebenwirkungen einer 5-FU Überdosierung sind schwere Diarrhöen, Hauttoxizität bis hin zu Epidermiolyse, Kardiotoxizität, Neurotoxizität und schwere hämatopoetische Toxizität. Durch die Kombination der Toxizitäten besteht ein hohes Lethalitätsrisiko, insbesondere, wenn die Toxizität spät erkannt wird. Zusätzlich zur DPD-Defizienz begünstigt auch der relativ enge therapeutische Bereich von 5-FU toxische Wirkungen; diese treten bei ca. 1-3% aller Patienten unter 5-FU Therapie auf.

Die homozygote Ausprägung (Prävalenz ca. 1:10000) gilt als Kontraindikation für eine Therapie mit 5-FU, aber auch heterozygote Träger der Mutation haben ein erhöhtes Risiko für toxische Nebenwirkungen, wobei eine Dosisreduktion das Risiko entsprechend verringern kann.

Eine Studie mit 487 Patienten ergab für die Durchführung der DPD-Genotypisierung einen positiv prädiktiven Wert von 62% sowie einen negativ prädiktiven Wert von 94% für eine 5-FU vermittelte Toxizität.⁷ In einer anderen Studie wurden der DPD-Genotyp neben dem weiblichen Geschlecht, der Art der FU Verabreichung (Bolus oder kontinuierlich) und Folsäure-Komedikation als unabhängiger Risikofaktor für 5-FU bedingte Toxizität identifiziert.⁸

Empfehlungen zur 5-FU-Therapie in Abhängigkeit des DPD-Genotyps:

Laut aktueller Literatur wird in Abhängigkeit des DPD-Genotyps folgende therapeutische Vorgehensweise empfohlen²

DPD Diplotyp	Genotyp	Phänotyp (rs3918290)	Empfohlene Dosisanpassung für 5-FU
*1/*1	GG	Wildtyp; normale Aktivität	Standard-Dosierung
*1/*2A	GA	Heterozygote Variante; intermediäre Aktivität	Dosisreduktion um 50% oder alternative Therapie auswählen (nicht Capecitabin oder Tegafur, da ebenfalls DPD-Substrate). Ev. Dosissteigerung je nach Dosis- und Wirkungs-Response
*2A/*2A	AA	Homozygote Variante; niedrige Aktivität	Alternative Therapie auswählen (nicht Capecitabin oder Tegafur, da ebenfalls über DPD metabolisiert)

Tab.1: DPD-Genotyp und empfohlene 5-FU Therapie²

ZUSAMMENFASSUNG

Indikation zur DPD-Genotypisierung:

Die DPD-Genotypisierung kann helfen, Patienten auszuwählen, die eine 5-FU Therapie wahrscheinlich tolerieren und einen adäquaten Response aufweisen werden.⁵

Von der Arbeitsgemeinschaft Internistischer Onkologen (AIO) wird empfohlen, alle Patienten vor Beginn einer 5-FU-Therapie auf das Vorliegen der DPD Exon-14-Skipping-Mutation zu analysieren, um diese häufige Ursache der durch 5-FU bedingten Toxizität frühzeitig erkennen zu können.¹ Bei heterozygotem Vorliegen einer DPD Exon-14-Skipping-Mutation muss die 5-FU-Dosierung entsprechend angepasst bzw. bei Homozygotie gar davon abgesehen werden.²

Testprinzip:

Die Genotypisierung erfolgt nach dem Prinzip einer gelbasierten PCR mit integrierter Sondenhybridisierung.

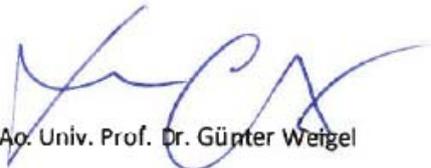
Probenmaterial: 3 ml EDTA-Blut. Bei längeren Transportzeiten (>30 min) ist die Probenanlieferung bei 4-8°C erforderlich (nicht frieren!). Zur Durchführung dieser Analyse ist keine Einverständniserklärung erforderlich!

Anforderung: Bei manueller Anforderung im Feld *Zusatzanalytik* „DPD-Genotypisierung“ vermerken oder online unter „DPD-Genotypisierung“ anfordern.

Bei Rückfragen: Tel.: 81590 (Isabella Staubmann), 81173 (Dr. Loacker), 82549 (Prof. Weigel)

Dauer der Untersuchung: max. 1 Woche nach Probeneingang.

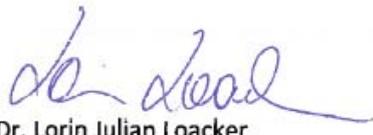
Für weitere Fragen stehen wir gerne zur Verfügung



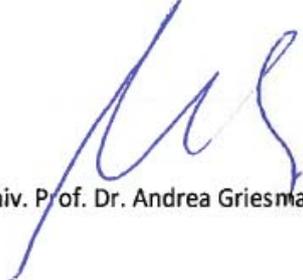
Ac. Univ. Prof. Dr. Günter Weigel



Mag. pharm. Dr. Gerhard Speer
Direktor der Anstaltsapotheke



Dr. Lorin Julian Loacker



Univ. Prof. Dr. Andrea Griesmacher

Innsbruck, im November 2012

Literatur:

- ¹ Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). Die Rolle der DPD-Bestimmung vor Beginn einer 5-Fluorouracil-haltigen Chemotherapie.
http://www.aio-portal.de/html/info/stellung_pw/stellungnahme2.pdf (09/2012)
- ² Swen JJ et al. Pharmacogenetics: From Bench to Byte - An Update of Guidelines. Clin. Pharm. & Ther. doi: 10.1038/clpt2011.34, 2011.
- ³ Amstutz et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. Pharmacogenomics. 2011 Sep;12(9):1321-36.
- ⁴ van Kuilenburg et al. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Ann Clin Biochem. 2003 Jan;40(Pt 1):41-5.
- ⁵ Raida et al. 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 Sep;7(9):2832-9.
- ⁶ Relling et al. Pharmacogenetics and cancer therapy. [Nat Rev Cancer](#). 2001 Nov;1(2):99-108.
- ⁷ Morel et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. [Mol Cancer Ther](#). 2006 Nov;5(11):2895-904.
- ⁸ Schwab et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. [J Clin Oncol](#). 2008 May 1;26(13):2131-8. Epub 2008 Feb 25.