

**Anne Nistad**

Bioingeniør med master i molekylærbiologi, fagbioingeniør ved Kreftgenomikk, Haukeland universitetssjukehus. E-post: anne.nistad@helse-bergen.no

**Tormod Karlsen Bjånes**

Spesialist i klinisk farmakologi med ph.d. innen kreftbehandling, overlege ved Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi, Haukeland universitetssjukehus.

**Marta Vorland**

Molekylærbiolog med ph.d., seksjonsleder Kreftgenomikk, Haukeland universitetssjukehus.

DPYD-genotyping – erfaringer fra Haukeland universitetssjukehus

Genvarianter kan ha stor betydning for dosering av legemidler. Genotyping av *DPYD* ble anbefalt som obligatorisk før oppstart av behandling med fluoropyrimidiner i 2020. Året etter ble den første farmakogenetiske analysen innført ved Haukeland universitetssjukehus (HUS).

Fluoropyrimidiner er en legemiddelgruppe som blant annet består av 5-fluorouracil (5-FU), kapecitabin og tegafur, og benyttes i behandlingen av flere ulike kreftformer, blant annet kolorektal- og brystkreft. Enzymet dihydropyrimidin dehydrogenase (DPD) er sentral i den inaktiverende metabolismen av slike legemidler (1). Manglende eller redusert funksjon av enzymet gir alvorlige bivirkninger.

Enzymet kodes av genet *DPYD*, og genotyping av dette genet ble nylig anbefalt som obligatorisk før oppstart av behandling med fluoropyrimidiner (2). Hensikten er å oppdage kjente genvarianter som medfører redusert eller manglende aktivitet i DPD, for å forebygge risiko for alvorlige overdoseringer og potensielt dødelige utfall som følge av

TABELL 1. Oversikt over klinisk relevante *DPYD*-genvarianter.

DPYD-genvariant		DPD-enzymaktivitet
Navn / betegnelse ¹	RefSNP-nummer	
*1 (Villtype)		Normal funksjon
*2A (c.1905+1G>A)	rs3918290	Inaktiv
*13 (c.1679T>G)	rs55886062	Inaktiv
c.2826A>T	rs67376798	Redusert funksjon
c.1236G>A	rs56038477	Redusert funksjon

¹ Referansesekvens NM_000110.4

bivirkninger i tarm, hud og beinmarg.

Hos inntil 60% av pasienter som utvikler alvorlige bivirkninger av 5-FU, er redusert DPD-aktivitet angitt som en sentral årsak. Deteksjon av genvarianter som gir redusert eller manglende aktivitet er dermed et viktig bidrag til pasientsikkerheten, slik at oppstartdosen kan reduseres eller et annet legemiddel velges. Det er internasjonal og nasjonal enighet om hvilke genvarianter som bør inngå i rutinemessig *DPYD*-genotyping, samt hvilke kliniske konsekvenser funnene har (3, 4).

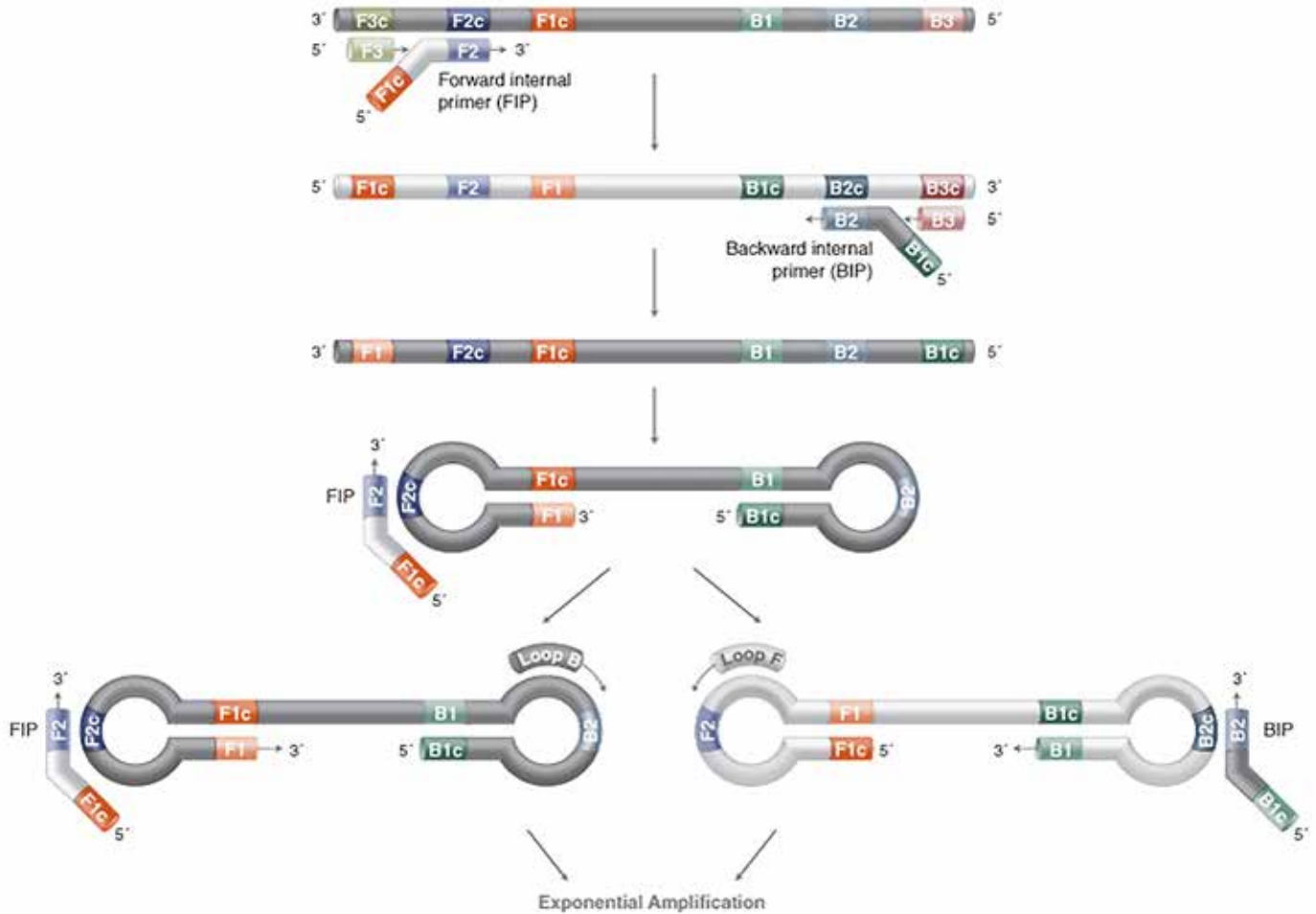
Ved Kreftgenomikk på HUS innførte vi genotyping av *DPYD* høsten 2021 i samarbeid med Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi. I denne artikkelen presenterer vi metoden vi bruker og våre erfaringer med etablering og drift av analysen.

DPYD-genvarianter av klinisk betydning

Det er store forskjeller i DPD-enzymaktivitet mellom individer. En rekke genva-

rianter av betydning for enzymaktivitet er påvist, men den kliniske relevansen er i mange tilfeller ikke avklart. Det er så langt funnet fire *DPYD*-genvarianter der det er en tydelig sammenheng med klinisk relevant endring i DPD-enzymaktivitet som har betydning for dosering av fluoropyrimidiner (3). To av variantene gir et inaktivt enzym, mens de to øvrige gir redusert funksjon (tabell 1).

Dersom det påvises inaktive varianter i begge alleler (homozygot), har pasienten trolig fullstendig manglende DPD-enzymaktivitet. Da må all bruk av fluoropyrimidiner unngås. Dette er svært sjelden (<0,5%), men ulike kombinasjoner av varianter (homozygote eller heterozygote) som gir redusert enzymaktivitet finnes hos 3 – 9 % av den kaukasiske befolkningen (5). Veiledende råd om reduksjon av dose gjelder ved oppstart av behandlingen. Men fordi det også innenfor samme genotype er stor variasjon i DPD-aktivitet, må den videre doseringen tilpasses individuelt basert på effekt og



FIGUR 1: Trinnvis oversikt over LAMP-reaksjon. LAMP-oppsettet kan skjematisert beskrives som todelt. I første del dannes en 2-loop-struktur som er utgangspunkt for syntese. I eksemplet er det seks bindingsdomener for primere F (forward) og B (backward, revers primer), C står for komplementært område. Når reaksjonsmiksen med DNA-templatet blir varmet opp til 65°C, vil en ha en blanding mellom dobbelt- og enkelt-trådet DNA slik at primere har mulighet for å binde seg til templatet og polymerasen kan starte DNA-syntesen. Forward inner primer (FIP) binder til området for F2c i 3'-enden av templatet. Denne primeren inneholder også et bindingssete som er komplementært til F1, som gir utgangspunkt for loop-dannelse. F3 (ytre forward primer) vil binde seg, slik at DNA-syntese kan starte fra det bindingssetet samtidig som den bidrar til

å frie FIP-amplifiseringsprodukt. FIP-amplifiseringsproduktet vil fungere som templat for syntesen fra backward inner primer (BIP). Den vil binde seg til område B2c og starte syntesen derfra. BIP har også et bindingssete som er komplementært til B1, som vil gi utgangspunkt for loop-dannelse. B3 bidrar til å frie ytre backward primer (BIP)-amplifiseringsprodukt, samtidig som en får en DNA-syntese også fra dette bindingssetet. Produktet fra B3 primer vil danne en DNA-tråd med en-loop-struktur mens produktet fra BIP primer vil ha to komplementære områder slik at det blir dannet loop både i 5' og i 3'-enden. Denne strukturen er utgangspunktet for DNA-syntesen, som foregår i del 2. En har da flere bindingsseter for primere som gjør at en har mange mulige og samtidige synteseveier. Figuren er hentet fra (6) (CC BY 4.0).

bivirkninger. Hos noen pasienter trengs ytterligere dosereduksjon, mens andre kan tåle normal dose (3).

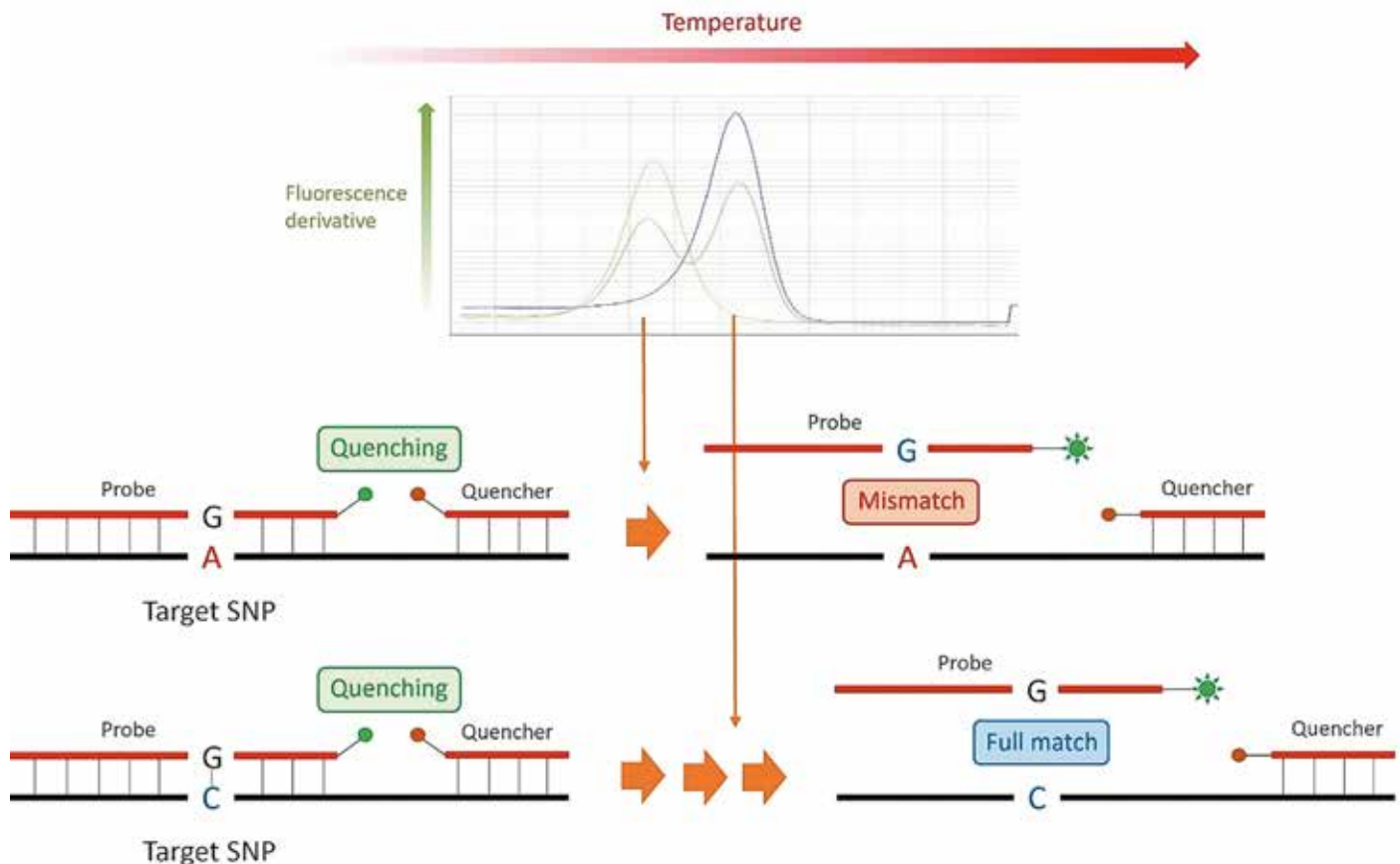
DPYD-genotyping med LAMP og smeltepunktsanalyse

Vi utfører genotyping av DPYD ved hjelp av Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). LAMP-metoden er en isoterm teknikk for DNA-amplifisering, der det benyttes en spesifikk DNA-poly-

merase som ikke er sensitiv for inhibitorer som finnes i blodet. Derfor trenger man ikke å bruke rensed DNA i reaksjonen, men kan benytte lysert EDTA-blod. Polymerasen har i tillegg høy aktivitet og evnen til å separere dobbeltrådet DNA, noe som eliminerer behovet for det varmedenaturerende trinnet som benyttes ved PCR-reaksjoner. Amplifiseringen kan derfor foregå ved en konstant temperatur, typisk 65°C grader. Spesielt

for metoden er at den også inneholder minst tre primerpar som gir økt sensitivitet og spesifisitet, sammenlignet med standard PCR-reaksjoner. Selve LAMP-reaksjonen er todelt. Først dannes en 2-loop-struktur som senere er utgangspunktet for DNA-syntesen (figur 1). Dette gir DNA-amplifisering med svært høyt utbytte på kort tid.

Amplifiseringsproduktene fra LAMP-reaksjonen har forskjellig lengde, ➤



FIGUR 2: Prinsipp for smeltepunktsanalyse. For å påvise genotypen til amplifiseringsproduktet benyttes smeltepunktsanalyse med sekvensspesifikke fluorescensprober og quenchere. Etter amplifisering senkes temperaturen slik at proben og quencheren binder til ønsket DNA-område. Bundet til DNA-molekylet vil quencheren hemme signalet fra proben. Under smeltepunktsanalysen økes temperaturen jevnt til 90° C, samtidig som endring i fluorescens måles. Når temperaturen økes vil proben og quencheren løsne fra DNA-tråden, og fluorescensen vil øke. Figuren er gjengitt med tillatelse fra LaCAR MDx.

avhengig av bindingssetet for primeren. Felles for alle produktene er at de inneholder området som skal undersøkes (7).

Etter amplifisering utføres smeltepunktsanalyse med sekvensspesifikke fluorescensprober og quenchere (figur 2). Ved å måle endringen i fluorescens, kan man bestemme hvilken genotype pasienten har. Proben er designet til å binde eksakt til enten villtype eller mutert allel. Det allelet som proben er designet for vil ha høyest smeltepunkt, siden bindingen mellom proben og DNA-et da vil være sterkest. Derfor vil smeltepunktene og smeltekurvene for hver av variantene være forskjellige, avhengig av om pasientprøven har villtype, heterozygot eller mutert genotype.

Analyse av DPYD-genvarianter

Vi bruker et analysekit fra produsenten LaCAR MDx til analyse av DPYD. Analy-

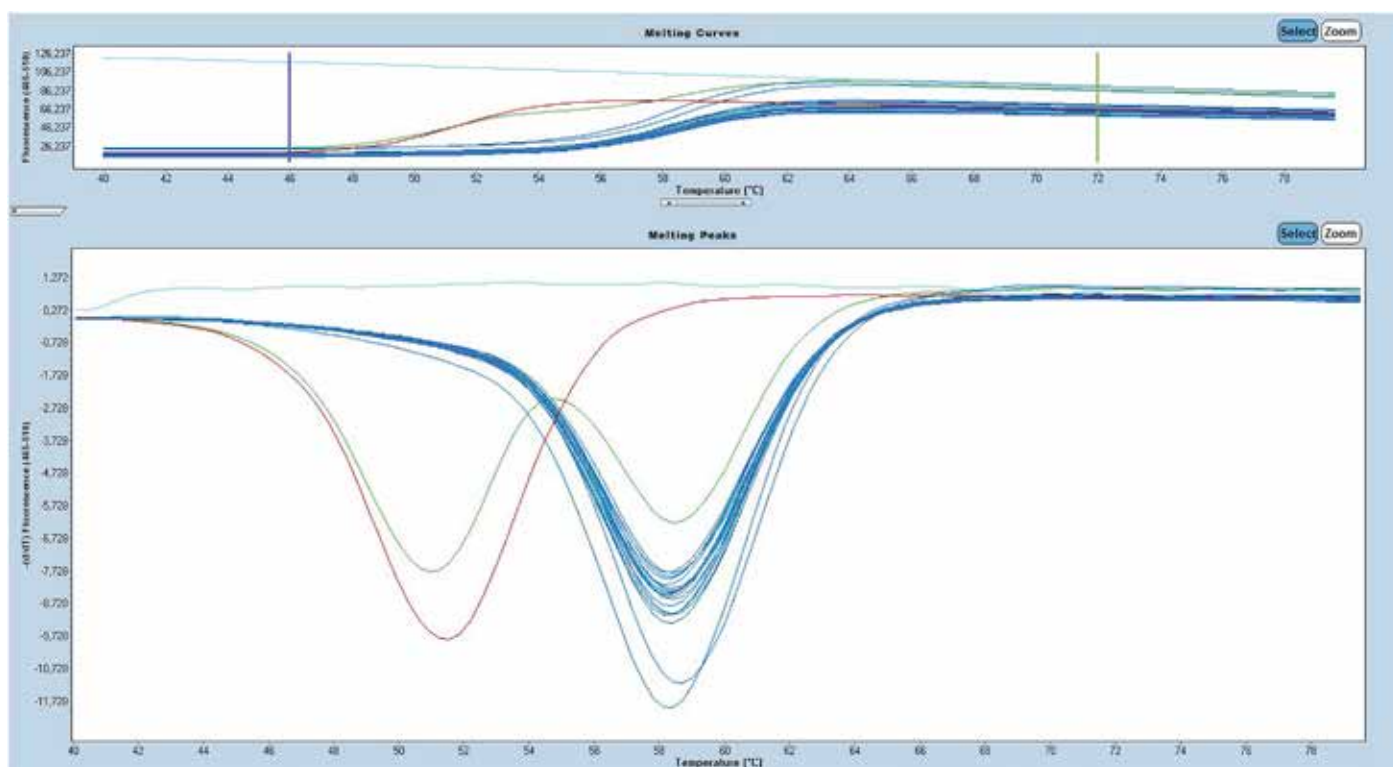
sekittet inneholder reagens for å analysere de fire DPYD-genvariantene som er listet i tabell 1. LAMP-metoden er ikke avhengig av rensed DNA, noe som gjør den spesielt egnet om en ikke har helautomatisert DNA-ekstraksjon tilgjengelig i laboratoriet. EDTA-blod blir først lysert med en lyseringsbuffer på en egen plate, og lysatet blir så overført til de fire forskjellige reaksjonsbufferne som er fordelt på qPCR-plate. Smeltekurvene sammenlignes med standarder med kjente genvarianter for å bestemme pasientens genotype. Svaret utgis til rekvirenten som en genotype og en kommentar om antatt enzymaktivitet og eventuelt anbefalt startdose av fluoropyrimidiner.

Figur 3 viser resultatet fra et analyseoppsett for DPYD-varianten c.1236G>A. Her er proben i analysekitet designet til å hybridisere med villtypefragmentet, og pasientprøver med normal variant (G) vil

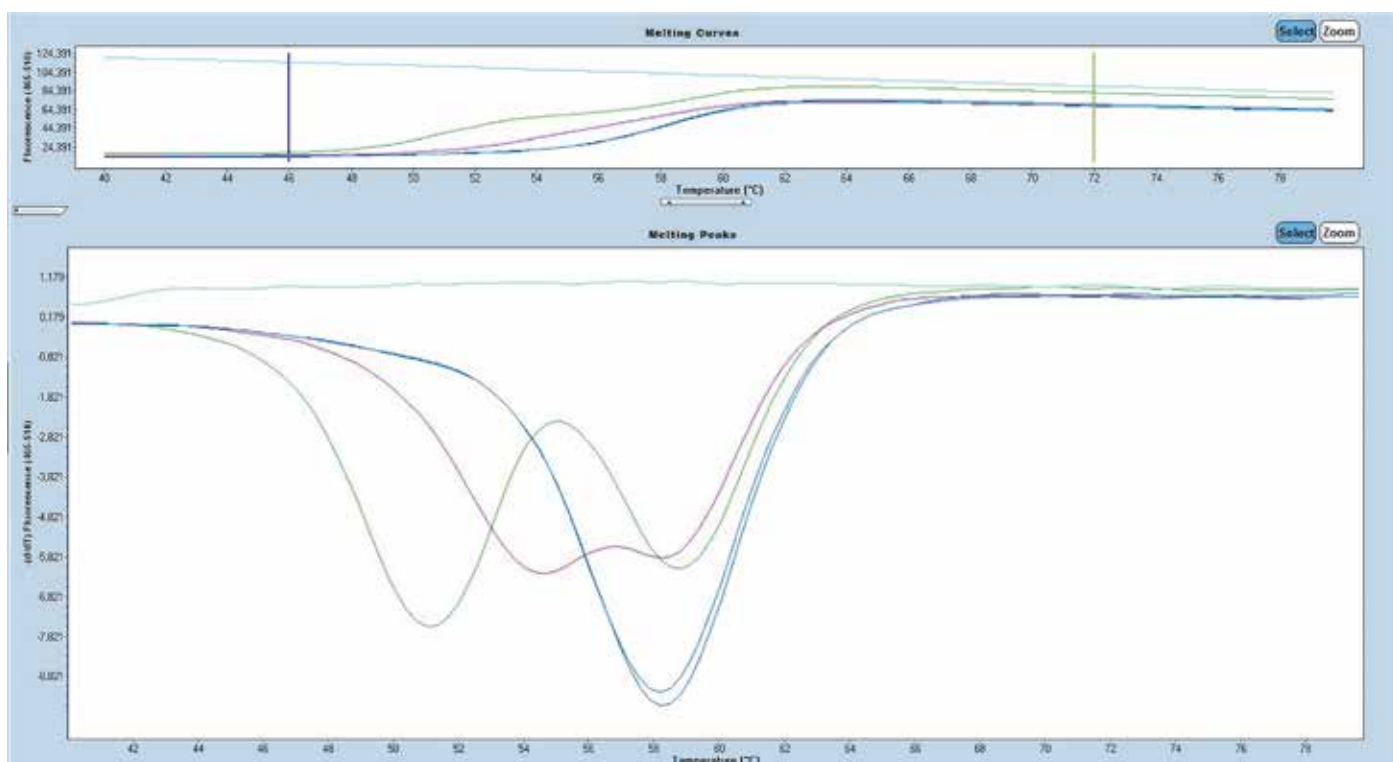
få et høyere smeltepunkt enn prøver med base A i samme posisjon. Prøver som får påvist heterozygositet (GA), har ett allel med normal aktivitet og ett allel med redusert aktivitet. Disse prøvene vil derfor ha to smeltepunkt.

To år med DPYD-genotyping

DPYD-analysen har vært i rutinedrift ved Kreftgenomikk på HUS siden august 2021. Analysen blir satt opp på et fast tidspunkt en gang i uken. Vi vurderer å øke til to ganger pr uke, dersom behov og ressurser tilsier det. Siden oppstarten har vi utført DPYD-genotyping på cirka 1800 pasientprøver. LAMP-metoden har vist seg å være en stabil og god metode. Det har vært få problemer med analyseoppsettene, slik at rekvirenten har fått svarene sine til avtalt tidspunkt. De aller fleste prøvene har normal genotype. Hos pasientene som får påvist DPYD-varian-



FIGUR 3: Eksempel på smeltekurver fra et analyseoppsett av *DPYD-c.1236G/A*. Normal variant (GG) har blå smeltekurve, begge alleler med variant A har rød og ved en heterozygot variant (GA) er smeltekurven grønn. Figur hentet fra analyse på LightCycler 480II (qPCR instrument fra Roche).



FIGUR 4: Eksempel på smeltekurve med usikkert resultat. Smeltekurvene viser et oppsett for *c.1236G>A*. Den grønne smeltekurven representerer heterozygot variant (*c.1236GA*), de blå representerer normal variant (*c.1236GG*), mens den rosa smeltekurven viser en pasientprøve hvor vi ikke klarer å bestemme varianten med LAMP-analysen. Prøven ble Sanger-sekvensert, og det ble fastslått at prøven var heterozygot for varianten *c.1229G>A* i tillegg til normalvarianten i posisjon *c.1236*. Tilleggsvarianten er kun syv basepar ifra den varianten det blir undersøkt for. Dette påvirker binding av probe, slik at smeltekurven blir annerledes enn forventet. Figur hentet fra analyse på LightCycler 480II (qPCR instrument fra Roche). ▶

ter, er det den heterozygote formen av c.1236G>A som er det mest vanlige funnet (tabell 2). Totalt er det funn på cirka 5 % av prøvene, noe som stemmer godt med forekomsten i en kaukasisk befolkning (5).

Metoden vi bruker påviser kun de listede variantene i tabell 1. Det er derfor viktig å ha en backup-metode som kan brukes når LAMP-metoden ikke kan fastslå genotypen, da rekvirenten er avhengig av et raskt svar for å kunne starte behandlingen. Dersom pasienten har andre varianter i umiddelbar nærhet til variantene listet i tabell 1, vil dette vises som ugjenkjennbare smeltekurver ved LAMP-oppsettet (figur 4). I slike tilfeller må andre metoder benyttes for å kunne fastslå varianten med sikkerhet, vi utfører da Sanger-sekvensering av aktuelle genområder.

Genvariantene som detekteres ved

genotyping av *DPYD* er medfødte, og et svar på denne analysen kan derfor sees på som endelig. Ved rekvirering av *DPYD*-genotyping på en pasient der svar allerede foreligger, vil analysen bli automatisk besvart med tidligere resultat. Dette sparer ressurser når reanalysering ikke er nødvendig. Dersom det er mistanke om prøveforbytting eller annen gyldig årsak til å få utført analysen på nytt, kan rekvirent be om dette spesielt.

Avslutning

Vi har delt våre erfaringer med innføring av *DPYD*-genotyping ved Kreftgenomikk. Analysevolumet tilsier at dette er en etterspurt analyse som kan utføres lokalt. Rekvirenten får raskere og tryggere svar fordi prøven ikke trenger å bli sendt ut av helseforetaket, og resultatet overføres elektronisk til journalsystemet (DIPS

Arena). Et raskere svar gjør at pasienten tidligere kan starte opp med behandling, med en dose som er tilpasset *DPYD*-genotypen. ■

Referanseliste

1. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, et al. Clinical relevance of *DPYD* variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1639–50.
2. European Medicines Agency. EMA recommendations on DPD testing prior to treatment with fluorouracil, capecitabine, tegafur and flucytosine: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommendations-dpd-testing-prior-treatment-fluorouracil-capecitabine-tegafur-flucytosine> (17.08.2023).
3. Tuv SS, Bjånes TK, Nørdal K. Genotyping kan gi færre bivirkninger ved kreftbehandling. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2020;140(15).
4. Haukeland Universitetssjukehus. Genotype, enzymaktivitet og anbefalt startdose av fluoropyrimidiner: <https://kvalitet.helse-bergen.no/docs/pub/dok73406.pdf> (25.09.2023).
5. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, Meulendijks D, Frederix GWJ, Kienhuis E, et al. *DPYD* genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1459–67.
6. New England BioLabs® Inc. Loop-Mediated Isothermal Amplification: <https://www.neb.com/en/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp> (17.08.2023).
7. Park, J-W. Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors.* 2022;12(10):857.

TABELL 2. Funn av *DPYD*-varianter med enzymaktivitet og tolkning. Tabellen viser en oversikt over funnene som er gjort ved genotyping av *DPYD* ved HUS i perioden august 2021 til august 2023. De fleste prøvene har en normal genotype, det er funn på cirka 5 %.

Variant	Antall funn
*1/*1 Villtype (normal genotype) ¹	Ca. 1700
Homozygot c.1236G>A ²	5
Heterozygot c.1236G>A ³	74
*1/*2A Heterozygot c.1905+1G>A ³	5
Heterozygot c.2846A>T ³	6
*1/*13 Heterozygot c.1679T>G ²	1

¹ Normal enzymaktivitet

² Redusert enzymaktivitet av DPD. Det er anbefalt at startdosen reduseres med 50 % hos pasienter med denne genotypen.

³ Redusert enzymaktivitet av DPD. Det er anbefalt at startdosen reduseres ned mot 50 % hos pasienter med denne genotypen.



Ser du etter en ny medarbeider?

Da bør du annonsere på bioingenioren.no!

Bioingeniøren presenterer stillingsannonser på bladets nettside, i nyhetsbrev og på Facebook. I våre kanaler treffer du de cirka 8 000 medlemmene av NITO Bioingeniørfaglig institutt (BFI).

For å bestille stillingsannonse på nett eller papir, send e-post til bioing@nito.no