

DNA-DPYD-genotyp

Bakgrund

Läkemedel metaboliseras av speciella enzymer i kroppen. Om generna som kodar för dessa enzymer innehåller någon variant kan enzymernas aktivitet förändras, vilket ibland kan få allvarliga konsekvenser för den behandlade patienten. 5-fluorouracil och kapecitabin är läkemedel som används vid behandling av framför allt gastrointestinal cancer, men även huvudhalscancer och bröstcancer. Dessa läkemedel metaboliseras av dihydropyrimidindehydrogenas (DPYD). 5% - 7% av alla européer har någon av varianterna c.1236G>A (HapB3), *13 (c.1679T>G), *2A (c.1905+1G) eller c.2846A>T i DPYD-genen. Av dessa är ca 0,02% homozygoter. Den vanligaste varianten är c.1236G>A, vilken hittas i ca 1/25 individer. De här varianterna minskar enzymets aktivitet och när läkemedlen inte kan brytas ned lika effektivt ökar toxiciteten, vilket leder till ökade biverkningar, som i vissa fall kan vara letala. Personer som är bärare av någon av dessa varianter bör därför ges lägre doser än normalt av fluoropyrimidiner eller ett alternativt läkemedel (Schultz et al. 2021).

Svar/Tolkning/Bedömning

Tolkning av analysresultaten görs enligt nedan (Tabell 1). Tabell 1. *Tolkning av mutationsanalyserna. DPYD genotyp Kommentar*

c.1236G>A G/G DPYD *1/*1. Normal metaboliserare. G/A DPYD *1/HapB3. Intermediär metaboliserare. A/A DPYD HapB3/HapB3. Intermediär metaboliserare. **c.1679T>G** T/T DPYD *1/*1. Normal enzymaktivitet. T/G DPYD *1/*13. Intermediär metaboliserare. G/G DPYD *13/*13. Mycket långsam metaboliserare. **c.1905+1G/A** G/G DPYD *1/*1. Normal metaboliserare. G/A DPYD *1/*2A. Intermediär metaboliserare. A/A DPYD *2A/*2A. Mycket långsam metaboliserare. **c.2846A>T** A/A DPYD *1/*1. Normal metaboliserare. A/T DPYD *1/c.2846A>T. Intermediär metaboliserare. T/T DPYD c.2846A>T/c.2846A>T. Intermediär metaboliserare.

Metodik/mätprincip

Metoden bygger på en PCR-reaktion där en specifik del av det genomiska DNA:t amplifieras. Dessutom ingår en hybridisering med en TaqMan-probe som är komplementär till det sekvensavsnitt där den aktuella punktmutationen finns. Två olika prober finns – en för WT-allelen och en för den muterade allelen.

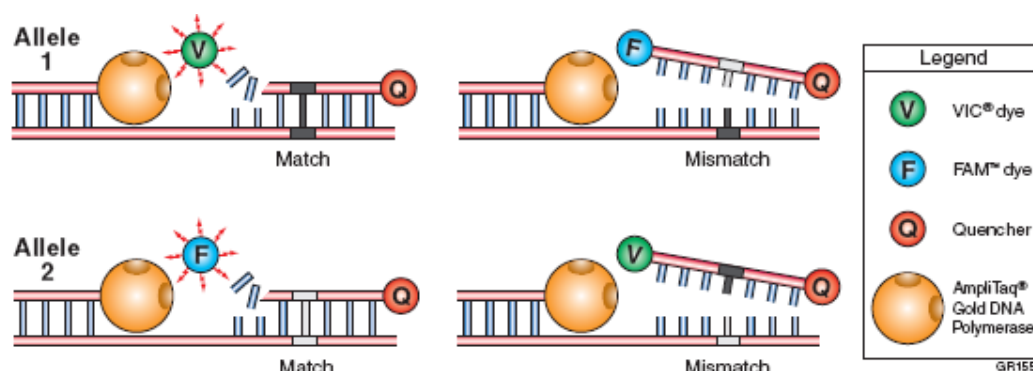


Fig. 1. TaqMan-principen. Proberna binder mellan inbindningsställena för forward- och revers-primer på DNA-templatet och är märkta med olika fluorescerande ”reporter”-färg för respektive allel (VIC™ eller FAM™). I motsatt ände av proben finns en quencher som släcker fluorescensen hos en intakt probe. Under PCR-reaktionen, i extensionssteget, degraderar Taq DNA-polymeraset proben, vilket gör att reporterfärgen frigörs och fluorescensen, som avges kan mätas (**Fig. 1.**).

Interferenser och felkällor

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer ger detta förändrad signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. Ospecifik priming ger upphov till låg eller felaktig genotypclustering i mjukvaran och kan t.ex. förekomma om någon annan närliggande variant än den undersökta förekommer i ett prov. Sådan interferens kan kontrolleras med Sangersekvensering.

Mätområde

Metoden påvisar homozygoti för wild type (wt) genotyp, heterozygoti, samt homozygoti för variant genotyp. Amplikonet begränsas av forward och reverse primers samt detekteras med reporter 1 respektive reporter 2. Detektionsgräns 10 ng patient-DNA används i reaktionen.

Varken nedre eller övre detektionsgräns har fastställts, men mindre mängd DNA bör inte användas.

Spårbarhet

Samtliga primers och prober är spårbara till nedan angivna sekvenser. **Gen**

Allel-nomenklatur HGVS -nomenklatur dbSNP rs-nr NCBI

Referenssekvens DPYD *2A c.1905+1G>A rs3918290 NG_008807.2

NM_000110.4 NP_000101.2 DPYD *13 c.1679T>G rs55886062 NG_008807.2

NM_000110.4 NP_000101.2 DPYD c.2846A>T rs67376798 NG_008807.2

NM_000110.4 NP_000101.2 DPYD HapB3 c.1236G>A rs56038477

NG_008807.2 NM_000110.4 NP_000101.2 **Riktighet** Metodens riktighet är säkerställd mot referenssekvens samt genom jämförelse av 29 olika prover mot andra laboratorier med full samstämmighet (se 13698930 Validering av alleldiskriminering av DPYD och TPMT på QuantStudio 7).

Referenslitteratur

Schultz A, Kohnke H, Wadelius M, Nygren P (2021) Fördelaktigt med genetisk analys före behandling med 5-florouracil. Läkartidningen 118:1-6.