

OPTIMALISATIE VAN MOLECULAIR GENETISCHE TESTEN IN DE FARMACOGENETICA

Britt Ghijssels

Masterproef in de opleiding Master in de Farmaceutische Zorg /
Geneesmiddelenontwikkeling

Academiejaar: 2022 – 2023

SAMENVATTING

Achtergrond en doelstelling: Farmacogenetica is een onderzoeksgebied waarin de associatie tussen genetische varianten en geneesmiddelrespons wordt bestudeerd. Dit met als doel de dosering van een geneesmiddel te optimaliseren. De evolutie van farmacogenetica de voorbije jaren is onmiskenbaar. Door de innovatie op technologisch vlak, wordt genotypering steeds meer de norm. Verschillende gen-geneesmiddel interacties zijn reeds bewezen waaronder het effect van *DPYD* varianten op fluoropyrimidines. Het *DPYD* gen codeert voor dihydropyrimidine dehydrogenase, dat verantwoordelijk is voor de afbraak van 5-Fluorouracil. Bepaalde *DPYD* varianten kunnen een DPD deficiëntie veroorzaken. Dit leidt tot een verminderde afbraak van 5-Fluorouracil met ernstige bijwerkingen als gevolg. In dit onderzoek worden verschillende *DPYD* testen geanalyseerd met als doel de validatie en klinische implementatie van een van deze testen in het universitair ziekenhuis van Gent.

Methode: In dit onderzoek worden twee testen gevalideerd namelijk de LAMP Human DPD Deficiency Kit van LaCar en de Taqman SNP Genotyping Assays van Thermo Fisher. Beide technieken worden hierbij vergeleken met de referentiemethode, Sanger sequencing. De beoordeling van deze technieken gebeurt o.b.v. een aantal criteria waaronder correctheid van resultaten, kostprijs, tijdsinname en efficiëntie van rapportering.

Resultaten: De grafieken van de drie testen geven telkens de vier functionele varianten correct weer. Bij de LAMP analyse wordt de variant 2843T>C benoemd als de functionele variant 2846A>T. We zien echter wel een afwijking in de curve dat dit indiceert. Bij het Taqman Assay worden correcte resultaten bekomen voor de analyse van de functionele varianten 1905+1G>A en 1236G>A. Het Taqman Assay is het duurst met € 47,38 per staal waarna Sanger sequencing en LAMP analyse volgen met respectievelijk € 39,43 en € 36,75. Sanger sequencing neemt het meeste tijd in beslag gevolgd door het Taqman Assay en de LAMP analyse.

Conclusie: In het algemeen worden de vier functionele varianten van het *DPYD* gen correct gedetecteerd door Sanger sequencing, LAMP analyse en Taqman Assays. Uit deze drie technieken blijkt de LAMP analyse de beste keuze voor de detectie van *DPYD* varianten.

DANKWOORD

Ik zou graag deze ruimte benutten om de mensen te bedanken die me de afgelopen maanden gesteund en geholpen hebben om deze masterproef mogelijk te maken.

Eerst en vooral zou ik graag mijn promotor, Kathleen Claes, bedanken voor de uitstekende begeleiding en voor me de kans te geven om dit onderzoek te doen.

Zonder haar hulp was deze masterproef niet mogelijk.

Daarnaast zorgde mijn begeleidster, Suzanne Vanhauwaert, steeds voor de nodige begeleiding en ondersteuning doorheen dit proces. Mede door haar kennis en feedback was het mogelijk deze masterproef tot een goed einde te brengen.

Ik zou ook graag de andere medewerkers van het CMGG bedanken voor de leuke werksfeer en voor de hulp. Er was steeds iemand bereid om mij te helpen wat een grote meerwaarde was.

Tenslotte zou ik graag mijn ouders, broer, vrienden en familie willen bedanken om mij telkens te motiveren in deze periode.

INHOUDSOPGAVE

1. INLEIDING	1
1.1. BASISBEGRIPPEN IN DE FARMACOGENETICA.....	5
1.1.1. DNA	5
1.1.2. Algemene begrippen	6
1.1.3. Begrippen m.b.t. genetische varianten	8
1.1.4. Nomenclatuur binnen de farmacogenetica.....	9
1.2. DPYD GEN.....	10
1.2.1. Algemeen.....	10
1.2.2. Fluoropyrimidines	10
1.2.3. Huidige analyse	13
1.3. DPYD TESTEN.....	15
1.3.1. Fenotypering	15
1.3.2. Sanger sequencer	15
1.3.3. LAMP Human DPD Deficiency Kit.....	17
1.3.4. Taqman SNP Genotyping Assays.....	19
2. OBJECTIEVEN	20
3. MATERIAAL EN METHODEN	21
3.1. SANGER SEQUENCING.....	21
3.1.1. Materiaal	21
3.1.2. Reagentia.....	21
3.1.3. Methode	21
3.2. LAMP HUMAN DPD DEFICIENCY KIT	24
3.2.1. Materiaal	24
3.2.2. Reagentia.....	24
3.2.3. Methode	24
3.3. TAQMAN SNP GENOTYPING ASSAYS	26
3.3.1. Materiaal	26
3.3.2. Reagentia.....	26
3.3.3. Methode	26
4. RESULTATEN	27
4.1. INTERPRETATIE GRAFIEKEN	27
4.2. VALIDATIE TESTEN.....	31
4.3. KOSTENANALYSE	36
4.3.1. Sanger sequencer	36
4.3.2. LAMP Human DPD Deficiency Kit.....	38
4.3.3. Taqman SNP Genotyping Assays.....	39
5. DISCUSSIE	41

6. CONCLUSIE	47
7. LITERATUURLIJST	48
8. APPENDIX	51

AFKORTINGEN

CPIC	Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium
DWPG	Dutch Pharmacogenomics Working Group
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
RNA	Ribonucleïnezuur
mRNA	Messenger RNA
WT	Wildtype allel
M	Mutant allel
STR	Short tandem repeat
CNV	Copy number variation
SNV	Single nucleotide variation
FdUMP	Fluorodeoxyuridine monofosfaat
FdUTP	Fluoro-deoxyuridine trifosfaat
FUTP	Fluorouridine trifosfaat
FBAL	Fluoro-beta-alanine
MM	Kapa2G Robust hotstart ready mix
RR	Ready reaction mix
PCR	Polymerase chain reaction
dNTP	Deoxynucleotide trifosfaat
ddNTP	Dideoxynucleotide trifosfaat
CMGG	Centrum Medische Genetica Gent
EMA	European Medicines Agency
HGVS	Human Genome Variation Society

1. INLEIDING

Farmacogenetica (Engelse term: pharmacogenomics) is een wetenschappelijke discipline waarin het effect van genetische variatie op geneesmiddelrespons wordt bestudeerd. Door deze variatie in kaart te brengen, kan de dosering van een geneesmiddel worden aangepast. Een bepaalde dosis kan bij de ene patiënt weinig effectief zijn, terwijl dit bij de andere patiënt zorgt voor ernstige bijwerkingen met in extreme gevallen de dood als gevolg. Genetische testen nemen een steeds belangrijkere rol in bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen om een zo hoog mogelijke doeltreffendheid en veiligheid te bereiken. (1)

De term farmacogenetica werd voor het eerst voorgesteld door de Duitse farmacoloog Friedrich Vogel in 1959. In 510 v.C. werd echter al een eerste voorbeeld beschreven door Pythagoras. Hij stelde vast dat sommige mensen een slechte reactie hadden op bepaalde voedingswaren zoals fava bonen. De beschrijvingen van Pythagoras werden later gekoppeld aan de term favisme. Bij favisme ontstaat hemolyse van de rode bloedcellen na consumptie van fava bonen. In 1956 ontdekten Carson et al. dat een deficiëntie van glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD) aan de basis ligt van deze aandoening. Dit leidde tot meer onderzoek rond de impact van genetische variabiliteit op inname van medicatie met het ontstaan van een nieuwe discipline, farmacogenetica. (2–5)

Voor high throughput sequenceringstechnieken ter beschikking waren, werd voornamelijk gewerkt met fenotyperingstechnieken. Hierbij worden bepaalde eigenschappen onderzocht die tot stand komen door expressie van een genotype. Een voorbeeld hiervan is de bepaling van de enzymactiviteit, die kan beïnvloed worden door genetische variatie in het gen dat codeert voor het enzym. Bij genotypering wordt het DNA gesequeneerd om mogelijke varianten op te sporen. (4)

De afgelopen jaren heeft het farmacogenetisch onderzoeksveld veel vooruitgang geboekt. Omwille van de innovaties op technologisch vlak wordt genotypering meer en meer de standaard, dankzij de daling van de kostprijs voor high-throughput sequencering. Er bestaan nu ook grote databanken waarbij de klinische gegevens van de patiënt in verband worden gebracht met zijn of haar genetische informatie. Een

voorbeeld hiervan is de UK Biobank waarbij meerdere bedrijven zoals AstraZeneca en Pfizer samenwerken om een grote hoeveelheid data ter beschikking te stellen. (6)

Tot op heden worden genetische testen voornamelijk gebruikt als reactieve test. Daarmee wordt bedoeld dat een genetische test pas wordt aangevraagd wanneer een bepaalde behandeling reeds is gestart en niet het gewenste resultaat oplevert. Hierbij kan het geneesmiddel een gebrek aan effectiviteit vertonen of een toxische reactie uitlokken. Het gebruik van farmacogenetische kennis voor dit doeleinde past in het huidige principe van “one size fits all”. Daarbij wordt een therapie opgesteld o.b.v. de gemiddelde patiënt in een populatie. (7) Sinds enkele jaren is er een evolutie richting gepersonaliseerde geneeskunde. Dit concept houdt in dat een therapie wordt opgesteld op maat van de individuele patiënt. Onder dit motto wordt gepleit voor meer preventief testen. Een voorbeeld dat dit concept volledig omarmt is de PREPARE studie (Pre-emptive Pharmacogenomic Testing for Preventing Adverse Drug Reactions). Kleinere studies toonden eerder al aan dat genotypering via een panel leidt tot een daling van hospitalisaties, zorgkosten en spoedgevallen maar er was nog onvoldoende bewijs omtrent de implementatie van zo een test in de praktijk. In de PREPARE studie werd een panel bestaande uit de 12 belangrijkste farmacogenen (*CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5*, *DPYD*, *F5*, *HLA-B*, *SLCO1B1*, *TPMT*, *UGT1A1*, *VKORC1*) gescreend voor varianten. Een genotypering werd uitgevoerd voor de 50 erfelijke varianten in deze genen. Bij detectie van een actionable variant werd de standaardtherapie gewijzigd o.b.v. de richtlijnen van de Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG). De controlegroep kreeg de standaardtherapie toegediend. Het primair eindpunt van dit onderzoek was de incidentie van klinisch relevante bijwerkingen. Verschillende zorginstellingen, zoals ziekenhuizen en apotheken, verspreid over zeven Europese landen namen deel aan de studie. Uit het onderzoek bleek dat een therapie gebaseerd op genotypering resulteerde in een reductie van klinisch relevante bijwerkingen van 30%. Finaal werd in deze studie aangetoond dat de implementatie van farmacogenetica mogelijk is in de praktijk en dat dit leidt tot minder toxische nevenwerkingen waardoor behandelingen veiliger worden. (8)

Dit is dan ook het belangrijkste voordeel van de introductie van farmacogenetica waarbij de zorgverlening voor de individuele patiënt verbeterd wordt. Tijdens de ontwikkeling van geneesmiddelen worden aspecten zoals dosering via een gerandomiseerde studie bepaald. De exclusiecriteria in die studies zijn vaak zeer strikt waardoor de groepen niet meer representatief zijn voor de samenleving. De participanten zijn meestal jonge, gezonde mannen terwijl zwangere vrouwen, kinderen, ouderen en andere risicogroepen worden uitgesloten ook al nemen deze bevolkingsgroepen ook het desbetreffend geneesmiddel. Statistieken tonen bijvoorbeeld aan dat bijna 90% van patiënten ouder dan 70 jaar in contact zullen komen met 1 of meer geneesmiddelen geassocieerd met een farmacogen. (1) Ook heeft een behandeling waarbij rekening wordt gehouden met farmacogenetische effecten een grote impact op het reduceren van bijwerkingen. Individualisatie van de geneesmiddeldosis zorgt voor een lager aantal overdosissen en de bijwerkingen die hiermee gepaard gaan. Cijfers tonen aan dat 3,5% van hospitalisaties geassocieerd zijn met bijwerkingen van geneesmiddelen. Bij ouderen is dit aantal nog hoger wegens een verhoogde gevoeligheid en polyfarmacie. Bijwerkingen beïnvloeden tevens in belangrijke mate de therapietrouw van de patiënt. Dit is een aspect dat vaak over het hoofd wordt gezien maar zeer relevant is. Een slechte therapietrouw komt het vaakst voor bij chronische aandoeningen en kan leiden tot het escaleren van de ziekte. Oorzaken van een slechte therapietrouw zijn voornamelijk bezorgdheid over de bijwerkingen, de noodzaak van de behandeling niet inzien en een negatieve connotatie rond het geneesmiddel. Bij chemotherapie bijvoorbeeld zullen de meeste mensen meteen denken aan de vele bijwerkingen zoals haaruitval en braken. Genetische testen kunnen de therapietrouw sterk bevorderen. Wanneer een persoon namelijk weet dat de therapie gepersonaliseerd is, kan dit een grote impact hebben op de ingesteldheid van de patiënt en de bezorgdheid rond de behandeling doen dalen.

Ondanks al deze voordelen staat de gezondheidssector nog voor verschillende uitdagingen die de klinische implementatie bemoeilijken. In het algemeen is het gebrek aan kennis over de farmacogenetica een groot werkpunt. Meer mogelijkheden tot educatie is een vereiste voor zowel patiënten als zorgverleners. Er is reeds gebleken dat opleidingen rond gepersonaliseerde, genetisch testen een grote meerwaarde bieden. Vervolgens moet er nog veel vooruitgang worden geboekt m.b.t. de regelgeving over genetische testen en klinische richtlijnen. Doordat er geen globaal

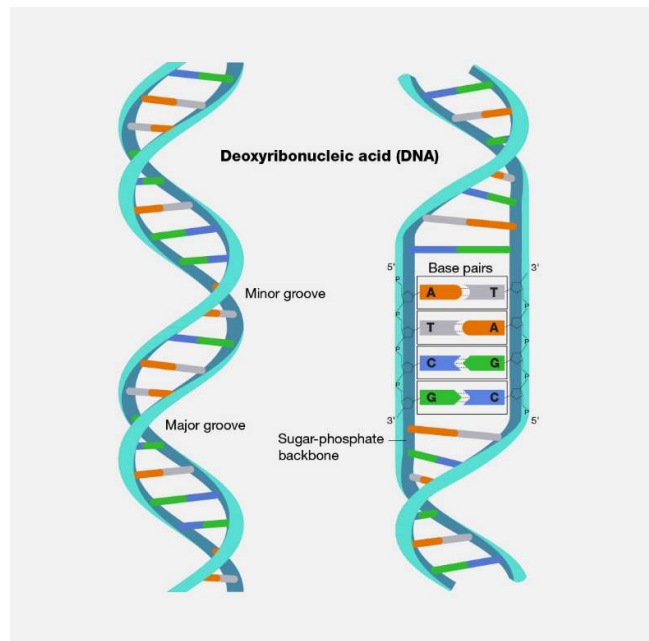
netwerk van experts bestaat binnen de farmacogenetica hebben verschillende landen hun eigen wetgeving wat het moeilijk maakt om een test te valideren of een studie uit te voeren op internationaal niveau. Nog een relevante uitdaging is het implementeren van privacy in de regelgeving, aangezien DNA van de patiënten nodig is om een farmacogenetische test uit te voeren. Daarom wordt vaak met een DNA code gewerkt om een staal te benoemen i.p.v. de patiëntnaam. Bij genoomonderzoek kunnen incidentele bevindingen vastgesteld worden, zoals pathogene varianten geassocieerd met een sterk verhoogd risico op kanker, dementie, etc. Dit maakt de regelgeving complexer aangezien deelnemers aan het vrijgeven van die informatie ethisch verantwoord moet zijn. Dit is minder toepasselijk voor farmacogenetica aangezien een volledig genoomonderzoek hier niet noodzakelijk is. Er zijn namelijk slechts een beperkt aantal loci waarbij de associatie met de geneesmiddelrespons vaststaat. Sommige testen worden ook niet terugbetaald door de ziekteverzekering of zijn niet klinisch gereguleerd wat de implementatie bemoeilijkt. Verschillende verenigingen zoals Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC) (<https://cpicpgx.org>) en DWPG (<https://www.knmp.nl/dossiers/farmacogenetica>) zijn actief bezig om klinische richtlijnen te voorzien binnen pharmacogenomics. Een bijkomend werkpunt is het gebrek aan studies met etnisch diverse populaties binnen de farmacogenetica. Dit is van groot belang aangezien sommige genetische varianten frequenter of uitsluitend voorkomen in een specifieke populatie. Het CYP2C19 poor metabolizer fenotype komt bijvoorbeeld in een veel hogere frequentie voor in de Aziatische bevolking in vergelijking met de Europese bevolking. Dit kan echter niet worden achterhaald zonder de inclusie van proefpersonen van Aziatische afkomst in studies. Ook zorgt deze diversiteit ervoor dat een test mogelijks op globaal niveau kan worden geïmplementeerd. Een laatste werkpunt is het nagaan van kosteneffectiviteit bij de klinische implementatie van een test. (6,9)

1.1. BASISBEGRIPPEN IN DE FARMACOGENETICA

Binnen de farmacogenetica wordt vaak gebruik gemaakt van specifieke terminologie. In de paragrafen hieronder wordt extra duiding gegeven bij de belangrijkste begrippen uit de farmacogenetica.

1.1.1. DNA

De humane cel bestaat uit 46 chromosomen en is diploïd. Dit betekent dat de chromosomen telkens in paar voorkomen en er dus 23 chromosoomparen aanwezig zijn in de cel. Een paar bestaat uit een chromosoom afkomstig van de moeder en een van de vader. In deze chromosomen ligt het DNA of erfelijke materiaal vervat. Het DNA is een aaneenschakeling van nucleotiden die door complementariteit een dubbele helixstructuur vormen. Elk nucleotide is samengesteld uit een fosfaatgroep, een suikergroep (desoxyribose) en een base. Deze nucleotiden worden vaak vernoemd naar hun base: adenine (A), cytosine (C), guanine (G) of thymine (T). De baseparen die de



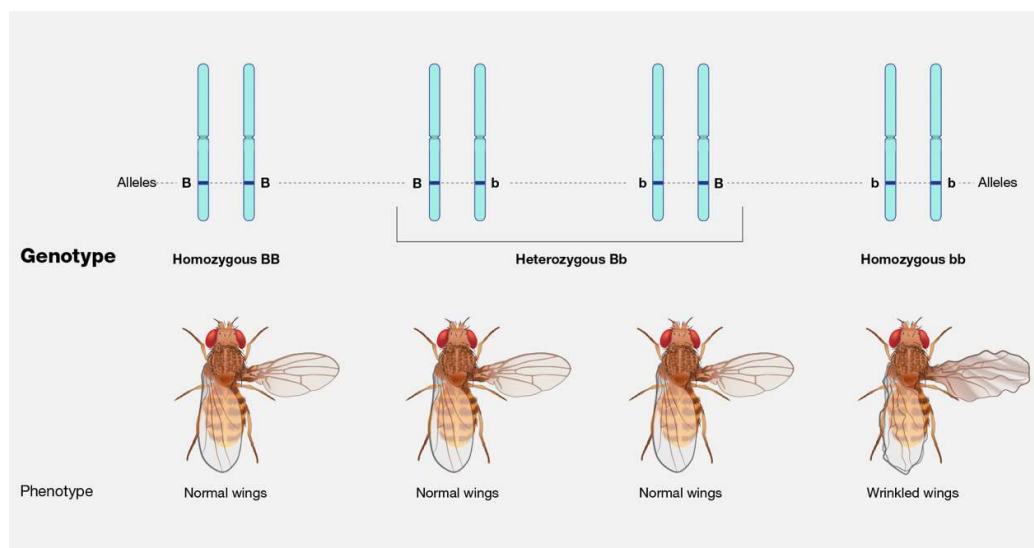
Figuur 1.1: Samenstelling DNA (43)

DNA structuur mogelijk maken zijn A-T en C-G. RNA heeft een gelijkaardige structuur maar is enkelstrengig en zal uracil bevatten i.p.v. thymine. De samenstelling van het DNA wordt eenvoudig weergegeven op figuur 1.1. Genen zijn een opeenvolging van kleine DNA fragmenten met een vaste plek op het chromosoom. Elk gen bevat de informatie voor een bepaalde erfelijke eigenschap. Sommige genen zullen bijvoorbeeld de informatie bevatten die nodig is voor de synthese van proteïnen. Die proteïnen zorgen dan in het algemeen voor de opbouw van fysische en biologische kenmerken. Het DNA dat codeert voor eiwitten neemt slechts 1,5% van het volledige genoom in beslag. (10)

DNA wordt eerst omgezet tot messenger RNA (mRNA) d.m.v. transcriptie en vervolgens tot proteïnen via translatie. RNA bevat zowel intronen als exonen. Tijdens de posttranscriptionele modificatie worden de intronen via splicing verwijderd. Het mature mRNA, bestaande uit exonen, zal vervolgens coderen voor een bepaalde aminozuursequentie. Na opvouwing van deze sequentie wordt een proteïne verkregen.

1.1.2. Algemene begrippen

Een genotype is de erfelijke informatie die aanwezig is op een locus in het genoom en bijdraagt tot een bepaalde observeerbare eigenschap namelijk het fenotype. Zo wordt het genotype van een specifiek gen voorgesteld door een paar allelen. Elk allel staat voor een ander kenmerk en wordt gesymboliseerd door een hoofdletter of kleine letter. Dit wordt geïllustreerd a.d.h.v. een voorbeeld op figuur 1.2. Een fenotype is een kenmerk zoals lichaamslengte en oogkleur dat tot stand komt door genexpressie. (11)



Figuur 1.2: Voorbeeld van genotype en fenotype. In dit voorbeeld zorgt het allel B voor normale vleugels terwijl allel b leidt tot gekreukte vleugels. Uit de afbeelding kan worden afgeleid dat B het dominante allel. (11)

Een allel is een mogelijke variant van een gen. Er is reeds vermeld dat een persoon telkens een chromosoompaar overerft. Dit betekent dan ook dat voor een locus op dat chromosoom er telkens 2 allelen aanwezig zijn. (12) Wanneer de twee allelen op een chromosoompaar hetzelfde zijn, dan is de persoon homozygoot voor dat allel. Wanneer ze verschillend zijn, is de persoon heterozygoot. Dit geldt echter niet bij de

geslachtschromosomen van een man. Het X-en Y-chromosoom van een man zijn namelijk niet identiek.

Een allel kan verdeeld worden in verschillende categorieën. Een voorbeeld hiervan is de onderverdeling tussen wildtype allel (WT) en mutant allel (M). Een wildtype allel is het allel dat het meest voorkomt in de populatie en als normaal wordt beschouwd. Een mutant allel is een variant die afwijkt van de norm.

Ook is er een differentiatie tussen een dominant en een recessief allel. Wanneer een individu twee verschillende allelen heeft zal het dominante allel altijd tot expressie komen en zo het fenotype bepalen. Het recessieve allel zal enkel tot uiting komen wanneer deze als een paar voorkomt en dus homozygoot aanwezig is.

Wanneer het gen codeert voor een enzym, zal elk allel gepaard gaan met een score die een maat vormt voor het functioneel effect van een allel. Het cijfer 1 staat voor een volledig functioneel allel, 0,5 staat voor een allel met verminderde functie en 0 is een niet-functioneel allel. De scores van beide allelen worden dan opgeteld om de functionaliteit van het enzym na te gaan. Een totaalscore van 2 betekent dat het enzym volledig functioneel is.

De term autosomaal wordt gebruikt met betrekking tot genetisch overdraagbare aandoeningen. Autosomaal betekent dat het gen dat verantwoordelijk is voor de ziekte plaatsvindt op een autosoom. Dit is een chromosoom dat geen geslachtschromosoom is. In elke cel zitten 23 chromosoomparen waarvan 1 paar bestaat uit de geslachtschromosomen. Bij een man wordt dit voorgesteld als XY en bij een vrouw als XX. (13)

Een haplotype stelt een unieke combinatie van allelen voor die een grote kans hebben om samen overgeërfd te worden. Dit komt doordat ze dicht bij elkaar liggen op hetzelfde chromosoom waardoor recombinaties tijdens de meiose zelden plaatsvinden (linkage disequilibrium). Haplotypes worden ook proxies genoemd. (14)

1.1.3. Begrippen m.b.t. genetische varianten

Het DNA kan verscheidene genetische varianten bevatten. (15) Enkele belangrijke zijn short tandem repeats (STR), copy number variations (CNV) en single nucleotide variations (SNV).

STR's zijn herhaalde, opeenvolgende, korte stukken DNA. Deze komen op verschillende plaatsen voor in het genoom en zijn sterk verschillend binnen een populatie. Vooral het aantal repeats is specifiek voor elk individu. De STR's worden o.a. gebruikt binnen het forensisch onderzoek om DNA sporen te linken aan een verdachte via de lengte van deze repeats.

CNV's (copy number variations) zijn variaties in het aantal kopieën van een bepaald stuk DNA tussen individuen. Deze verschillen kunnen ontstaan door deleties of inserties van basen en verschillen in omvang. (16)

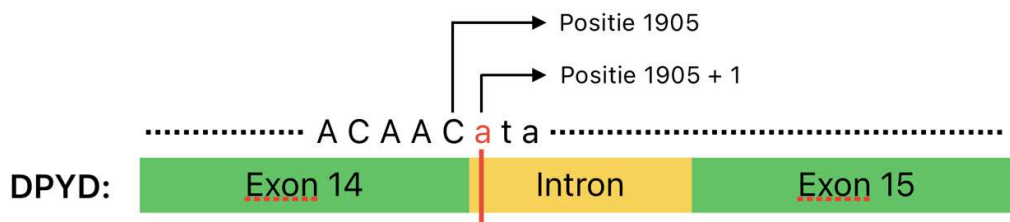
SNV's (single nucleotide variations) zijn de meest voorkomende genetische varianten. Een SNV wordt gedefinieerd als een variant in het DNA waarbij slechts 1 of een beperkt aantal nucleotiden betrokken is. SNV's kunnen voorkomen in zowel coderend als niet-coderend DNA. Een puntmutatie kan op verschillende manieren voorkomen namelijk via een transitie, transversie, deletie of insertie. Bij een transitie wordt een purine vervangen door een ander purine of een pyrimidine door een ander pyrimidine. Bij een transversie wordt een purine vervangen door een pyrimidine of omgekeerd. Bij een deletie wordt een nucleotide uit de sequentie verwijderd terwijl bij een insertie een nucleotide wordt toegevoegd. (17,18)

Een farmacogen is een gen dat codeert voor een eiwit dat een belangrijke invloed heeft op de werking van een specifiek geneesmiddel..

Een actionable genetische variant is een variant op een farmacogen dat de geneesmiddelrespons zodanig wijzigt dat een klinische interventie noodzakelijk is. Dit kan onder de vorm van een dosisaanpassing van het geneesmiddel of een therapieswitch. (7)

1.1.4. Nomenclatuur binnen de farmacogenetica

Voor een correcte rapportering moeten de benamingen van de genetische varianten gekend zijn. Allereerst is er de Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclatuur. Deze benaming bestaat uit drie delen namelijk de positie van het gen in het chromosoom, de SNV positie en het bekomen aminozuur. Een wijziging van het aminozuur is enkel van toepassing bij varianten in een exon. De varianten worden meestal benoemd o.b.v. een referentiesequentie. De referentie voor dit onderzoek is het cDNA wat wordt voorgesteld met een 'c.' in de benaming van de SNV positie. De nummering van de nucleotiden gaat als volgt. Voor de exonen wordt gestart bij het startcodon ATG. Nucleotide 1 is dan A, nucleotide 2 is T, enz. tot aan het laatste nucleotide van het stopcodon. Bij de intronen zijn twee notaties mogelijk. Als het nucleotide dicht bij het 5' uiteinde van het intron ligt, gebeurt de telling in relatie tot het laatste nucleotide van het exon dat upstream ligt van het intron. Daarna volgt een plusteken en de positie van het nucleotide in het intron. Bij een nucleotide dat dicht bij het 3' uiteinde ligt, begint de telling na het eerste nucleotide van het exon dat downstream ligt. Dan volgt een minteken en de positie van het nucleotide in het intron.



Figuur 1.3: Schematische voorstelling van de variant NM_000110.4(DPYD):c.1905+1G>A

Een voorbeeld van deze benaming is NM_000110.4(DPYD):c.1905+1G>A. Deze benaming verwijst naar een puntmutatie van G naar A. Deze variant vindt plaats op het eerste nucleotide van het intron dat downstream ligt van exon 14 in het *DPYD* gen. Een schematische voorstelling hiervan wordt weergegeven in figuur 1.3. Een andere notering die veel voorkomt is de Reference SNP cluster ID (rsID) bv. rs3918290. Hiermee kan met hoge precisie een variant gevonden worden in de verschillende databases zoals NCBI en HapMap. Het star allel nummer associeert een specifiek allel met een getal. Voor het voorbeeld is dit DPYD*2A. Het wildtype allel wordt voorgesteld met nummer 1 en andere allelen krijgen een hogere ster-annotatie. (19–21)

1.2. *DPYD* GEN

1.2.1. Algemeen

Het *DPYD* gen is 950 kilobasen (kb) groot en is gelegen op chromosoom 1p22. Het bestaat uit 23 exonen en 4399 nucleotiden. *DPYD* vertoont een grote variabiliteit. Reeds meer dan 30 varianten zijn gekend voor het gen. *DPYD* codeert voor het enzym dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). Dit enzym is de initiële en snelheidsbepalende stap in de metabolisatie van de nucleotiden thymine en uracil. Het zorgt voor de omzetting van thymine en uracil naar 5,6-dihydrothymine en 5,6-dihydrouracil. DPD deficiëntie is een autosomaal recessieve aandoening die leidt tot verhoogde concentraties van thymine en uracil in bloed, urine en cerebrospinaal vocht. De meeste varianten in *DPYD* hebben geen invloed op de enzymfunctie maar een aantal varianten veroorzaken een DPD deficiëntie. Dit is een autosomaal, recessieve aandoening die leidt tot verhoogde concentraties van thymine en uracil in bloed, urine en cerebrospinaal vocht. De symptomen zijn afhankelijk van de ernst van de enzymdeficiëntie. De meest frequente symptomen zijn een vertraagde ontwikkeling op cognitief en motorisch vlak en convulsies. Andere symptomen zoals microcefalie, autisme en groeiretardatie komen in mindere mate voor. De meeste mensen zijn echter asymptomatisch. (19,22–24)

1.2.2. Fluoropyrimidines

Pharmacogenomics is van groot belang in oncologie. Chemotherapeutica zijn namelijk gekend voor hun nauw therapeutisch interval wat kan leiden tot zeer ernstige dosisgerelateerde neveneffecten. De juiste dosis vinden is dan ook noodzakelijk voor de veiligheid van de patiënt. De fluoropyrimidines 5-FU, Capecitabine en Tegafur worden zeer vaak gebruikt voor de behandeling van tumoren. Ze werken in op o.a. gastro-intestinale kankers, borstkanker en hoofd-halskanker. Meestal worden ze toegediend als combinatietherapie met andere antineoplastische middelen. (22)

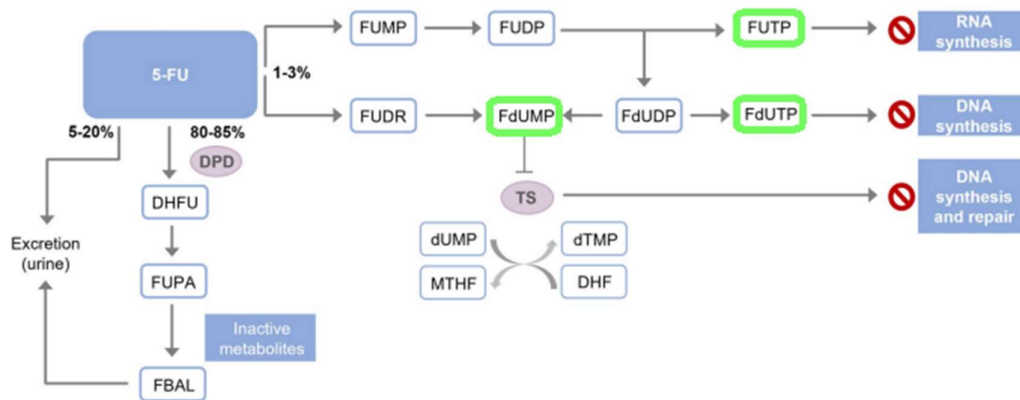
5-FU wordt intraveneus toegediend en wordt vooral gebruikt bij gastro-intestinale maligniteiten zoals colorectale kanker. Een combinatietherapie met Methotrexaat en Leucovorine is mogelijk. Ook is er een specifieke therapie voor pancreaskanker namelijk Folfirinox (5-FU, Irinotecan en Oxaliplatin). Bij borstkanker wordt het 5-FU meestal via een bolus toegediend terwijl bij dikkedarmkanker de behandeling via een infuus wordt gegeven. (19,23,25,26)

Capecitabine is een prodrug van 5-FU en wordt oraal toegediend. Dit geneesmiddel wordt vooral gebruikt bij de behandeling van darmkanker en metastatische borstkanker. Bij een gemetastaseerd mammacarcinoom is zowel een monotherapie mogelijk als een therapie in combinatie met Docetaxel. (27)

Tegafur is eveneens een prodrug en wordt oraal ingenomen voor de behandeling van maagkanker. Tegafur kan gebruikt worden in combinatie met Uracil, Gimeracil of Oteracil. Uracil en Gimeracil zorgen voor een reversibele inhibitie van DPD en remmen zo de afbraak van 5-FU. Oteracil veroorzaakt een daling in activiteit van 5-FU. Er is slechts weinig bewijs m.b.t. de invloed van *DPYD* varianten op de toxiciteit van deze combinatietherapieën. De dosisaanbevelingen voor een patiënt met een *DPYD* variant zijn dan ook ongekend bij deze therapie. Daarom is een behandeling met Tegafur niet aangeraden volgens de CPIC richtlijnen. (19,28)

5-FU is een pyrimidineanaloog dat fungeert als een antimetabool. Slechts 1-3% van de toegediende dosissen wordt via de anabolische pathway omgezet tot cytotoxische metabolieten. Het merendeel (80%) van het geneesmiddel wordt via de katabolische pathway gedegradeerd en uitgescheiden via de urine. Een klein percentage wordt onveranderd via de urine geëlimineerd.

In de anabolische pathway worden cytotoxische metabolieten in de lever gevormd. Deze zullen de metabolisatie van pyrimidines op verschillende manieren inhiberen. Het fluoropyrimidine wordt afgebroken tot drie metabolieten namelijk fluorodeoxyuridine monofosfaat (FdUMP), fluoro-deoxyuridine trifosfaat (FdUTP) en fluorouridine trifosfaat (FUTP). FdUMP zal covalent binden op thymidylaatsynthase (TS), een enzym dat belangrijk is voor de synthese van purines en pyrimidines. Het enzym zorgt namelijk voor de omzetting van dUMP naar dTMP met 5,10-methyleen tetrahydrofolaat uit de folaatcyclus als methyl donor. De inhibitie van dit proces leidt tot een tekort aan dTMP. Dit resulteert in een depletie van dTTP waardoor de synthese van de andere deoxynucleotiden ook wordt verstoord. De overmaat aan dUMP leidt mogelijks tot meer dUTP dat foutief in het DNA wordt geïmplementeerd. De inhibitie van TS zorgt uiteindelijk voor schade aan het DNA en een remming van de DNA synthese. Ook zal incorporatie van FdUTP en FUTP in DNA en RNA zorgen voor een daling in de synthese. Deze mechanismen veroorzaken finaal een inhibitie van de celdeling en celgroei van de kankercellen. De metabolisatiepathway wordt geïllustreerd in figuur 1.4. (29–31)



Figuur 1.4: Anabolische en katabolische pathway van 5-FU (30). 5-fluorouracil (5-FU), dihydrofolaat (DHF), dihydrofluorouracil (DHFU), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), deoxythymidine monofosfaat (dTMP), deoxyuridine monofosfaat (dUMP), α -fluoro- β -alanine (FBAL), fluorodeoxyuridine difosfaat (FdUDP), fluorodeoxyuridine monofosfaat (FdUMP), fluorodeoxyuridine trifosfaat (FdUTP), fluorouridine difosfaat (FUDP), fluorodeoxyuridine (FUDR), fluorouridine monofosfaat (FUMP), 5-fluoroureidopropionzuur (FUPA), fluoro-uridine trifosfaat (FUTP), 5,10-methyleen tetrahydrofolaat (MTHF), thymidylaatsynthase (TS)

In de katabolische pathway wordt 5-FU omgezet naar fluoro-beta-alanine (FBAL). Dit is een inactief metaboliet dat via de urine wordt geëlimineerd. De eerste en snelheidsbepalende stap in deze pathway is de omzetting van 5-FU naar dihydrofluorouracil (DHFU). Deze stap wordt gekatalyseerd door DPD. Een tekort aan DPD door een loss of functie variant in het *DPYD* gen zorgt voor een daling in de klaring van 5-FU en een verhoogde halfwaardetijd. Als gevolg krijgen we een accumulatie van het actief bestanddeel in het lichaam waardoor een groter percentage via de anabolische pathway wordt omgezet. Een ernstig DPD deficiëntie in combinatie met een 5-FU behandeling kan leiden tot een overdosis met levensbedreigende bijwerkingen en soms de dood als gevolg. Deze bijwerkingen zijn o.a. myelosuppressie, diarree, mucositis, neutropenie, neurotoxiciteit en hand-voet syndroom. Bij een hevige toxische reactie op 5-FU krijgt de patiënt hemodynamische ondersteuning, antibiotica, parenterale voeding, uridine triacetaat (UT) enz. UT is het antidoot voor fluoropyrimidines en moet oraal worden toegediend. Het antidoot fungeert als een prodrug van uridine. Het wordt in het lichaam gedeacetyleerd waardoor uridine in de circulatie terechtkomt. Uridine zal vervolgens in competitie gaan met de cytotoxische metabolieten en zo de werking van 5-FU inhiberen. (19,23,30,32)

1.2.3. Huidige analyse

In het universitair ziekenhuis van Gent (UZGent) wordt uitgebreid onderzoek gedaan m.b.t. genetisch overerfbare aandoeningen. Verscheidene testen, waaronder farmacogenetische testen, worden uitgevoerd om tot een diagnose te komen. Sinds 2019 is het aantal aanvragen voor *DPYD* testen sterk gestegen. Screening van *DPYD* varianten wordt vooral aangevraagd binnen het gebied van de gastro-enterologie. Ook gyneco-oncologen vragen dit regelmatig aan voor de dosering van Capecitabine. (1) Initieel werd in 2019 de *DPYD* analyse uitgevoerd via NGS door het sequencen van de volledige coderende sequentie van het gen. Aangezien de rapporteertijd opliep tot 2 weken, wat niet in overeenstemming was met de klinische noden en ook resulteerde in varianten met onduidelijke klinische betekenis, werd in 2021 besloten om over te gaan tot Sanger sequencering van de regio's waarin varianten gelegen zijn geassocieerd met toxiciteit. Deze vier varianten zorgen voor een daling in enzymactiviteit. De variant NM_000110.4(DPYD):c.1905+1G>A of DPYD*2A bevindt zich in het intron aangrenzend aan exon 14. Deze variant muteert de splice donorsite van exon 14, waardoor alternatieve splicing optreedt en exon14 wordt uitgespliced. Dit werd reeds eerder geïllustreerd in figuur 1.3. De mutatie resulteert in een volledig verlies van functie en DPD enzymactiviteit wat wordt aangegeven door een score 0. Ook de variant NM_000110.4(DPYD):c.1679T>G (p.Ile560Ser) of DPYD*13 zorgt voor een allel zonder functie met score 0. De variant NM_000110.4(DPYD):c.2846A>T (p.Asp949Val) heeft een score van 0,5 wat betekent dat het allel resulteert in een verminderde enzymactiviteit. De laatste variant waarvoor wordt gescreend is NM_000110.4(DPYD):c.1236G>A (p.Glu412=), ook HapB3 genoemd. Deze variant is echter niet de oorzaak van de enzymdeficiëntie. De variant NM_000110.4(DPYD):c.1129-5923C>G ligt in intron 10 en creëert een cryptic splicing site wat de genexpressie wijzigt en zo zorgt voor een verminderde functie van het enzym. Beide varianten liggen in linkage disequilibrium en worden steeds samen overgeërfd als haplotype. Omdat sequencering van het exon toelaat om ook eventuele andere varianten te detecteren in het exon, werd ervoor geopteerd om te screenen voor de variant in de coderende regio. De hotspot varianten met hun benaming en frequentie in Europa worden voorgesteld in tabel 1.1. In het verder verloop van deze tekst wordt gebruik gemaakt van de verkorte benamingen van de varianten zoals weergegeven in de tabel. (19,33–36)

Tabel 1.1: Benaming en frequentie varianten (33–35)

SNV positie	rsID	Star allel nummer/ triviale naam	Frequentie in Europa
1905+1G>A	rs3918290	DPYD*2A	0.007917321
1679T>G	rs55886062.1	DPYD*13	0.0002832076
2846A>T	rs67376798	/	0.0037400308
1236G>A	rs56038477	HapB3	0.023735587
1129-5923C>G	rs75017182		

Via sequencering wordt de aanwezige variant met bijhorende score achterhaald per allel. De scores voor de twee allelen worden dan opgeteld. De uiteindelijke score staat voor een bepaald genotype. Het fenotype dat hiermee gepaard gaat, geeft de enzymactiviteit weer. De dosisreductie wordt aan de hand van deze activiteit bepaald. Dit wordt weergegeven in tabel 1.2. Na toediening moet de dosis indien nodig worden aangepast afhankelijk van de toxiciteit die wordt waargenomen bij de patiënt. (25)

Tabel 1.2: Bepaling dosisreductie a.d.h.v. genotype en fenotype (25,30)

Score	Genotype	Fenotype	Dosisreductie
2	Twee functionele allelen	Normale metabolisatie	Toedienen van standaarddosis
1,5	Heterozygoot voor een allel met verminderde functie	Intermediaire metabolisatie	50%
1	Homozygoot voor een allel met verminderde functie Twee allelen met een verminderde functie		
0,5	Een allel met een verminderde functie en een allel zonder functie	Zwakke metabolisatie	Therapie wordt afgeraden
0	Homozygoot voor een allel zonder functie		

1.3. *DPYD* TESTEN

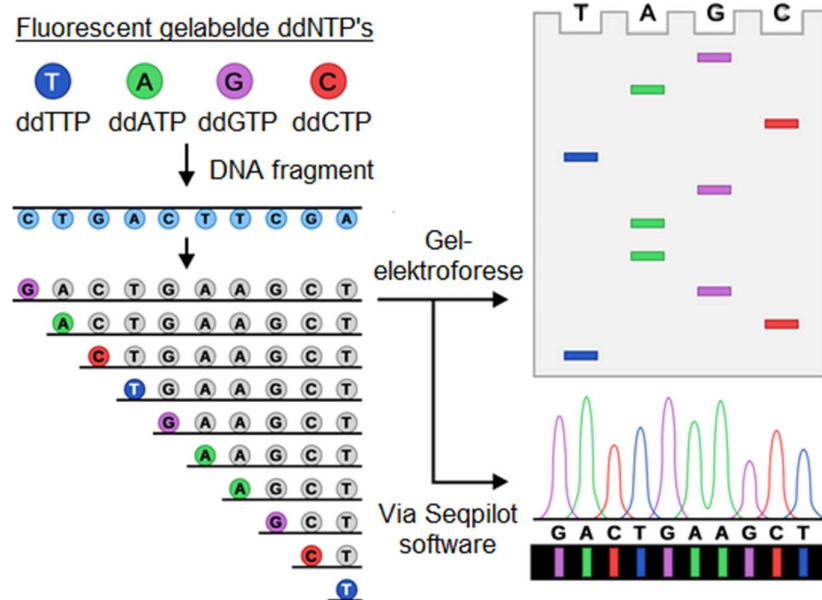
1.3.1. Fenotypering

Fenotypering wordt minder frequent uitgevoerd in het UZGent wegens o.a. het gebrek aan terugbetaling en de veeleisende pre-analytische condities van de bloedstalen. Toch is het naast genotypering een zeer goede techniek om de enzymdeficiëntie op te sporen. Deze techniek heeft o.a. een hogere sensitiviteit dan de genotypering. In het fenotypisch onderzoek wordt het gehalte uracil en de dihydrouracil/uracil ratio bepaald in het plasma. De focus ligt echter meer op uracil aangezien uit onderzoek is gebleken dat dit de toxiciteit beter kan voorspellen. Kwantificatie van uracil en dihydrouracil wordt meestal verricht via high performance liquid chromatography (HPLC) met een detectiemethode naar keuze. Als detector wordt vaak geopteerd voor de massapectrometer. De combinatie van HPLC met tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) staat gekend voor zijn hoge sensitiviteit en specificiteit. De analyse wordt uitgevoerd op een bloedstaal met anticoagulans. Als de uracilconcentratie hoger is dan 100 ng/ml, is er sprake van een volledige DPD deficiëntie en wordt een behandeling met 5-FU of Capecitabine afgeraden. Een waarde tussen de 14 en 100 ng/ml wordt geassocieerd met een gedeeltelijke deficiëntie. Dit betekent een hoog risico op toxiciteit bij toediening van een fluoropyrimidine. Een dosisreductie van 50% wordt aangeraden. Als het gehalte uracil lager is dan 14 ng/ml, heeft DPD een normale enzymactiviteit en kan de behandeling zonder enige aanpassing gestart worden. (25)

1.3.2. Sanger sequencerig

Tot op heden wordt de genotypering van *DPYD* in het UZGent uitgevoerd d.m.v. cycle sequencerig. Deze werkwijze is sterk gebaseerd op Sanger sequencerig. Allereerst moeten de DNA-fragmenten geamplificeerd worden via een polymerase chain reaction (PCR). Dit omdat Sanger sequencerig een lagere amplificatie capaciteit heeft en dus meer startmateriaal vereist. Hierna wordt het DNA gedenatureerd bij hoge temperatuur om de gewenste enkelstrengige fragmenten te verkrijgen. Vervolgens worden de primer en het DNA polymerase toegevoegd bij een lagere temperatuur. Deze zijn noodzakelijk voor de verlenging van de DNA-fragmenten. Tenslotte worden de 4 deoxynucleotide trifosfaten (dNTP's) en de 4 dideoxy NTP's (ddNTP's) toegevoegd in een ratio van 100 op 1. Deze ddNTP's zijn fluorescent gelabeld wat detectie mogelijk maakt. Bij deze stap zal de primer binden aan het DNA. Het polymerase kan dan

dNTP's inbrengen in de groeiende DNA ketens. Wanneer echter een ddNTP wordt ingevoegd, zal de synthese stopgezet worden. Dit omdat een ddNTP geen vrije 3' hydroxylfunctie meer heeft waar verder kan op gebouwd worden. Bij deze procedure worden een aantal cycli uitgevoerd van opeenvolgend denaturatie en synthese. Zo wordt uiteindelijk een mengsel bekomen van DNA ketens van allerlei lengtes. Na opzuivering wordt dit mengsel geanalyseerd via de fragment analyzer. De fragmenten komen terecht in een capillair met polyacrylamide. De twee elektrodes veroorzaken een elektrisch veld. Het negatief geladen DNA zal migreren naar de kathode elektrode. Hoe kleiner de fragmenten, hoe verder ze zullen migreren. Via laserfluorescentie detectie komen we te weten welk nucleotide aanwezig is op de verschillende loci van de sequentie. Dit komt doordat de ddNTP's gelabeld zijn met fluorescente merkers die elk een ander kleur zullen weergeven bij detectie. Finaal worden de resultaten gegenereerd. D.m.v. de software Seqpilot wordt een grafiek bekomen waarbij de gekleurde pieken telkens een nucleotide op een bepaalde plaats in de sequentie voorstellen. Deze sequentie wordt dan vergeleken met de referentie sequentie. Het volledige proces wordt kort geïllustreerd in figuur 1.5.



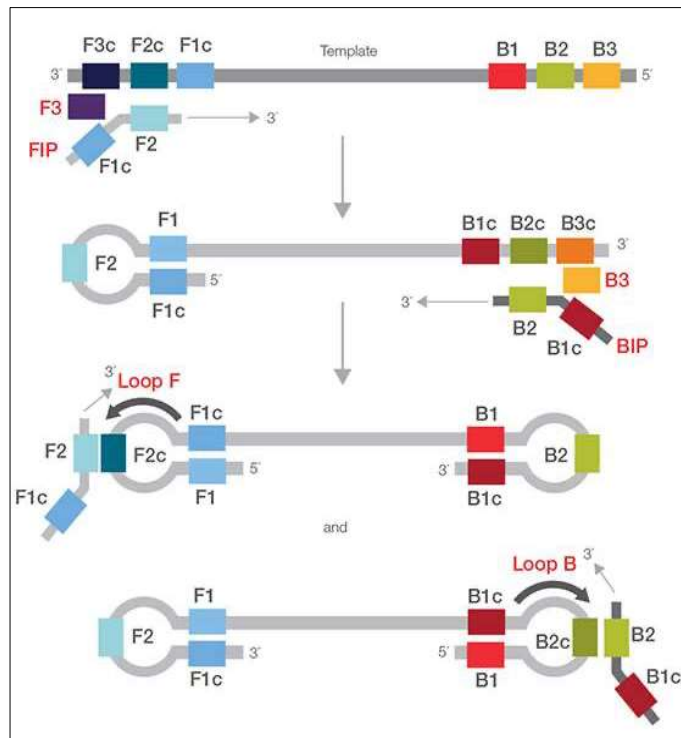
Figuur 1.5: Principe Sanger sequenering (44)

1.3.3. LAMP Human DPD Deficiency Kit

In dit onderzoek wordt de LAMP Human DPD Deficiency Kit van het Belgische bedrijf, LaCar, getest. Voor deze analyse wordt gebruik gemaakt van loop-mediated isothermal amplification (LAMP) i.p.v. PCR om de DNA-fragmenten te vermenigvuldigen. Zoals de term weergeeft, is de techniek isothermaal wat betekent dat de volledige reactie bij eenzelfde temperatuur plaatsvindt (65°C) in vergelijking met PCR. De amplificatie van de regio's rond de 4 *DPYD* varianten gebeurt met behulp van 3 paar primers en een polymerase met high strand displacement activiteit. Door vorming van een dumbbell structuur worden meer initiatiesites voor de primers gesynthetiseerd waardoor de amplificatie sneller verloopt.

Het specifieke mechanisme van LAMP wordt weergegeven in figuur 1.6. Eerst

denatureert het dubbelstrengig DNA waardoor het target DNA wordt verkregen. Een eerste primer, namelijk de forward inner primer (FIP) bindt dan op de F2c sequentie en wordt verlengd door het polymerase. De F3 primer of forward outer primer bindt op F3c en wordt ook verlengd waardoor de vorige streng loskomt. Op de figuur is te zien dat de F2 primer een 5' overhang heeft. Dit is van groot belang want deze sequentie is

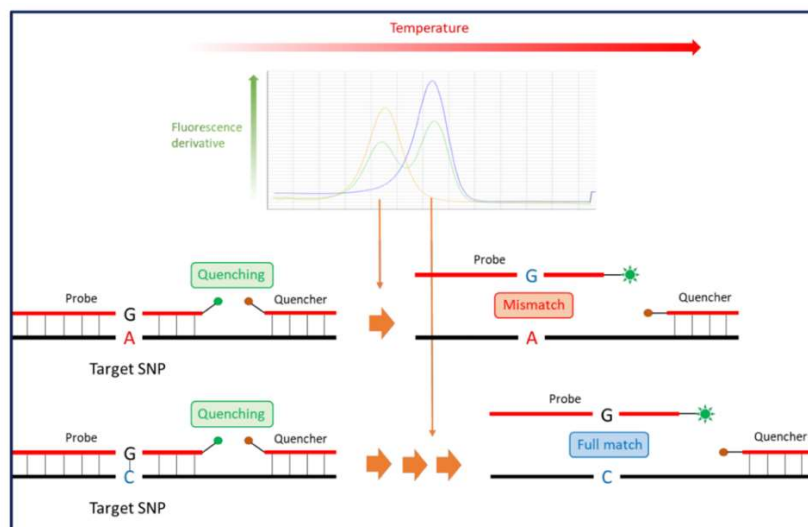


Figuur 1.6: Mechanisme LAMP (45)

complementair met de F1

sequentie van dezelfde streng en zorgt voor de vorming van een loop. Hetzelfde fenomeen vindt plaats aan het 5' uiteinde van de streng m.b.v. de backward inner primer (BIP) en de B3 primer. Eens de loops gevormd zijn, kunnen de 2 loop primers binden. Deze zorgen ervoor dat de amplificatie nog sneller verloopt. (37)

Na LAMP worden de varianten gedetecteerd via een smeltcurve analyse. Bij de DPYD kit van Lacar hoort reeds een uitgebreid analyseplatform ontwikkeld door Lacar zelf genaamd Genefox. De grafieken worden als volgt bekomen. De temperatuur wordt verlaagd waardoor de probes de gevormde fragmenten kunnen hybridiseren. Deze probe bevat een quencher op het 3' uiteinde en een fluorofoor op het 5' uiteinde. Bij hybridisatie migreren de quencher en de fluorofoor naar elkaar toe waardoor de intensiteit van de fluorescentie daalt. Daarna wordt de temperatuur geleidelijk aan verhoogd waardoor de probes terug loskomen. Doordat de probes vrij zijn, worden de quencher en de fluorofoor terug van elkaar gescheiden en stijgt de fluorescentie. Uit deze analyse kan dan een smeltcurve worden opgesteld met de fluorescentiegraad in functie van de temperatuur. Het volledige proces wordt geïllustreerd in figuur 1.7. (37)



Figuur 1.7: Voorstelling smeltcurve analyse (37)

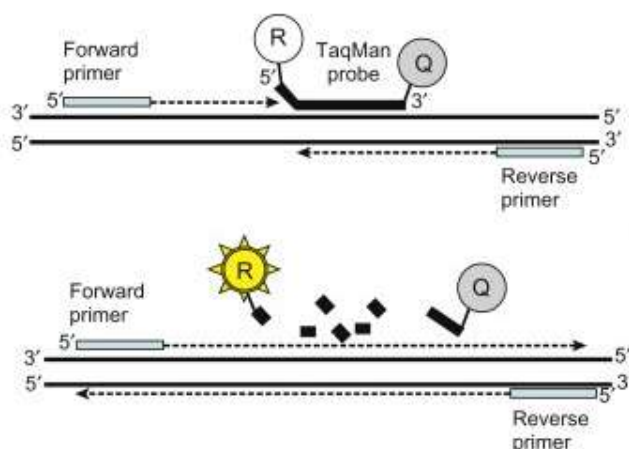
De aanwezigheid van een *DPYD* mutatie wordt afgeleid uit de temperatuur waarbij de probe loskomt. Bij een gemuteerd fragment zal de probe door de mismatch sneller loskomen en dus bij een lagere temperatuur een fluorescentiepiek vertonen. Dit geldt voor 3 van de 4 hotspot varianten. Bij *DPYD**13 zal de probe echter bij een hogere temperatuur loskomen. Dit omdat de probe voor dit assay complementair is met het mutante allel. Een mismatch wordt hier veroorzaakt wanneer het wildtype allel aanwezig is. (37)

1.3.4. Taqman SNP Genotyping Assays

Een tweede *DPYD* analyse die wordt getest in dit onderzoek, maakt gebruik van de Taqman SNP Genotyping Assays van het Amerikaanse bedrijf, Thermo Fisher. De assays worden verdeeld in drie soorten namelijk Taqman Predesigned SNP Genotyping Assay, Taqman Custom SNP Genotyping Assay of Taqman DME Genotyping Assay. De Predesigned Assays zijn reeds aangemaakt door het bedrijf. Deze producten worden vooraf getest om een goede kwaliteit en minimale functionaliteit te verzekeren. De DME Assays zijn gecreëerd om varianten te detecteren in specifieke genen. Deze genen coderen voor proteïnen die een rol spelen in de metabolisatie. De assays ondergaan een uitgebreide kwaliteitscontrole in tegenstelling tot de Predesigned Assays. Als laatste kan ook zelf een assay voor een bepaald target worden samengesteld m.b.v. de Custom TaqMan Assay Design Tool. De kwaliteitscontrole gebeurt dan op dezelfde manier als bij de Predesigned Assays. In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van een Taqman Predesigned SNP Genotyping Assay voor de detectie van 1236G>A en een Taqman DME Genotyping Assay voor de detectie van 1905+1G>A. (38)

In deze assays worden de fragmenten geamplificeerd d.m.v. een PCR reactie. Elk assay bevat een specifieke forward-primer en reverse-primer zodat de gewenste sequentie wordt geamplificeerd. Daarnaast zal het assay ook twee minor groove binder (MGB) probes bevatten met een quencher die niet fluorescent gelabeld is (NFQ) en een fluorofoor. Deze probes zijn noodzakelijk voor de detectie van de variant. De aanwezigheid van een MGB zorgt ervoor dat de smeltemperatuur van de probe stijgt. Als gevolg zal na hybridisatie een stabiel complex worden gevormd. Deze methode maakt het mogelijk om kortere probes te synthetiseren die met een hoge specificiteit de allelen kunnen differentiëren. De twee MGB probes binden respectievelijk op het WT allel of op het M allel en bevatten het VIC™ fluorofoor of het FAM™ fluorofoor. De PCR reactie begint met de denaturatie van het DNA en de activatie van het Taq-polymerase bij hoge temperatuur. Wanneer de temperatuur daalt tot 60°C, zullen zowel de primers als de probe binden met het DNA fragment. De hybridisatie van de probe door binding met het DNA fragment veroorzaakt quenching van de fluorofoor met een daling van de fluorescentie als gevolg. Hierna worden de primers verlengd door het polymerase. Tijdens de amplificatie, wordt de probe afgebroken door de 5'-

exonuclease activiteit van het polymerase. De fluorofoor wordt hierdoor gescheiden van de quencher waardoor de fluorescentie stijgt. Een illustratie van dit proces wordt weergegeven in figuur 1.8. Na de PCR reactie, wordt de data geanalyseerd via de Quantstudio software. Hierbij wordt een grafiek gegenereerd met de fluorescentiegraad van FAM op de y-as en de fluorescentie van VIC op de x-as. Zo wordt een spreidingsdiagram bekomen waaruit het resultaat kan worden afgeleid. (38)



Figuur 1.8: Principe Taqman Assay (46)

2. OBJECTIEVEN

Het doel van dit onderzoek is de validatie van een nieuwe methode voor de genotypering van *DPYD*. Sanger sequencing is de techniek die tot op heden wordt toegepast in het UZGent voor *DPYD* analyse. Er zijn echter andere testen die deze genotypering kunnen uitvoeren op een snellere manier. Dit is zeer belangrijk aangezien de startdosis van het chemotherapeuticum, 5-FU, wordt bepaald o.b.v. de resultaten van de analyse. Het is dus van cruciaal belang dat de analyse zo snel mogelijk gebeurt zodat de behandeling van de kankerpatiënt meteen van start kan gaan. In dit onderzoek worden de LAMP Human DPD Deficiency Kit van LaCar en de Taqman SNP Genotyping Assays van Thermo Fisher getest. Hierbij wordt Sanger sequencing gebruikt als referentietechniek. Om de testen met elkaar te vergelijken, baseren we ons op een aantal criteria. De voornaamste zijn correctheid van resultaten, kost, tijdsduur en efficiëntie van rapportering. Andere belangrijke punten die zullen aan bod komen zijn materiaalverbruik en moeilijkheidsgraad van de test. Tot slotte wordt vooruitgeblikt naar de bijdrage van deze technieken in de toekomst.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1. SANGER SEQUENCING

3.1.1. Materiaal

De volgende materialen zijn noodzakelijk bij het uitvoeren van Sanger sequencing: micropipetten, pipettips, epjes, 96-well microtiterplaten, een PCR-toestel (Thermal Cycler) en een fragment analyzer. De specificaties van het materiaal worden weergegeven in bijlage 3.1.

3.1.2. Reagentia

De reagentia die worden gebruikt voor de sequencing zijn Kapa2G Robust hotstart ready mix (MM), universele FORD primers met M13 sequentie, DNA stalen, Milli-Q water, antarctic fosfatase (5000U/ml), exonuclease I (3000U/ml), BigDye® Terminator v3.x Cycle Sequencing Kit, CleanDTR beads en ethanol (verdunding 85%). De specificaties van de reagentia worden weergegeven in bijlage 3.1.

3.1.3. Methode

Bij Sanger sequencing wordt eerst PCR uitgevoerd onder FORD condities om het DNA te repliceren. In het Centrum Medische Genetica Gent (CMGG) maakt FORD deel uit van het algemene protocol voor Sanger sequencing en PCR gebaseerde NGS. Met FORD condities wordt bedoeld dat de primer een concentratie van 2 μM heeft en het DNA moet worden verdund tot een concentratie van 20 ng/ μl . Per staal worden vier assays verricht duidend op de vier hotspot varianten van *DPYD*. Allereerst wordt 5 μl MM met een micropipet toegevoegd aan de welletjes. Dan worden de FORD primers gevortexd en gepipetteerd met een volume van 2,5 μl . De forward-primer en reverse-primer zitten samen en zijn specifiek voor elke variant. Deze primers zullen na denaturatie binden op het enkelstrengig DNA. Vervolgens wordt 2,5 μl van het verdunde DNA staal toegevoegd. Het is hierbij belangrijk om telkens het DNA nummer en de naam van de patiënt te controleren. Op het einde wordt de wellplaat geseald met een folie en wordt de plaat kort gecentrifugeerd om al het materiaal naar de bodem te brengen. De PCR oplossingen worden in het PCR-toestel gebracht en via het programma KAPA60 wordt een FORD PCR gestart. Dit programma heeft een totale duur van 55 minuten en wordt weergegeven in tabel 3.1.

Tabel 3.1: KAPA60 programma

Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Aantal cycli
95,0	00:03:00	1
95,0	00:00:15	34
60,0	00:00:10	34
72,0	00:00:15	34
72,0	00:01:00	1

Na de PCR reactie, wordt het product opgezuiverd. Dit betekent dat alle ongebonden primers en dNTP's worden geïnactiveerd. De opzuivering gebeurt aan de hand van twee enzymen namelijk antarctic fosfatase en exonuclease. Deze zijn thermolabiel en worden bewaard bij -20°C. Ook wanneer de enzymen worden gebruikt, moeten deze op ijs worden gezet.

Allereerst wordt een mix gemaakt met een bepaald volume exonuclease, antarctic fosfatase en water. Dit is afhankelijk van het aantal stalen. Voor 20 stalen zijn de volumes respectievelijk 1 µl, 4 µl en 15 µl. De enzymen moeten meteen terug in de diepvries worden geplaatst na gebruik. Hierna wordt de mastermix gevortexd en wordt aan een nieuwe wellplaat per well 1 µl toegevoegd m.b.v. een repetierpipet. Daarna wordt 5 µl van het correcte PCR product erbij gepipetteerd. Hierbij wordt telkens nog eens op en neer gepipetteerd om de reagentia te vermengen. De wellplaat wordt geseald met een harde folie en gecentrifugeerd. De plaat wordt uiteindelijk op het PCR toestel geplaatst en het programma EXO_AP wordt ingezet. Daarbij wordt eerst verwarmd tot 37°C om de enzymen te activeren zodat ze hun functie kunnen uitoefenen. Daarna wordt de hitte opgedreven tot 80°C om de thermolabele enzymen te inactiveren. De totale duur van dit programma is 50 minuten en het programma is weergegeven in tabel 3.2.

Tabel 3.2: EXO_AP programma

Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Aantal cycli
37,0	00:15:00	1
80,0	00:20:00	1

Na de opzuivering worden de PCR producten gesequeneerd. Hierbij wordt eerst een sequencingmix aangemaakt. De samenstelling van deze mix wordt weergegeven in tabel 3.3.

Tabel 3.3: Mastermix voor 30 PCR producten

RR	0,5 µl
ABI-buffer 5x	2 µl
Primer (1 µM)	2 µl
Water	4,5 µl

Dit wordt twee maal uitgevoerd namelijk voor de forward primer en voor de reverse primer. De twee mixen worden nadien gevortexd. Aan de ene wellplaat wordt 9 µl sequencing mix met forward-primer toegevoegd en aan de andere 9 µl mix met reverse-primer. Vervolgens wordt er 1 µl PCR product gepipetteerd in elk welletje. De wellplaten worden geseald en gecentrifugeerd zodat ze klaar zijn om op het toestel te worden geplaatst. Bij deze stap wordt het programma SEQUENCING gestart waarvan de details worden voorgesteld in tabel 3.4.

Tabel 3.4: SEQUENCING programma

Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Aantal cycli
95,0	00:02:00	1
95,0	00:00:10	24
55,0	00:00:05	24
60,0	00:02:00	24
15,0	00:10:00	1

Na Sanger sequencering moet nog een opzuivering gebeuren om onder andere de vrije ddNTP's en primers te scheiden van de DNA-fragmenten. Dit gebeurt via magnetische beads. Om te beginnen moeten deze goed gevortexd worden om de beads te resuspenden. Daarna wordt aan elke well 10 µl beads toegevoegd via de repeteerpipet. Vervolgens wordt ethanol 85% aangemaakt door ethanol te verdunnen met water. Hiervan wordt 45 µl toegevoegd via een multichannel pipet en waarna alles wordt vermengd. De wellplaten moeten nu 3 minuten op de magneet geplaatst

worden. Gedurende deze periode zal het DNA aan de beads binden en de beads worden aangetrokken door de magneet naar de bodem. Hierna wordt het supernatans met de onzuiverheden zoals vrije ddNTP's verwijderd. Als wasstap wordt nog eens 100 µl 85% ethanol toegevoegd en eruit gepipetteerd. Nu moeten de platen 10 minuten lang blijven staan om te drogen. Dan wordt 40 µl water toegevoegd waarna terug 10 minuten moet worden gewacht. Na die 10 minuten, wordt de inhoud van de platen vermengd d.m.v. een pipet. Vervolgens worden de platen 30 seconden op de magneet geplaatst. Dit zorgt ervoor dat resterende onzuiverheden aan de beads blijven hangen en men een supernatans bekomt met enkel de gewenste DNA-fragmenten. Uit dit supernatans wordt telkens 30 µl gepipetteerd en overgebracht in 2 nieuwe wellplaten met harde rand die bedoeld zijn voor de analyse. De platen worden geseald met een dunne folie en kort afgedraaid waarna ze worden geanalyseerd op de fragment analyzer.

3.2. LAMP HUMAN DPD DEFICIENCY KIT

3.2.1. Materiaal

Het materiaal dat we nodig hebben om de LAMP analyse uit te voeren is pipetten, pipettips met filter, epjes, PCR-strips, een Lightcycler 480 384-wellplaat met bijhorende sealing folie en de Lightcycler 480 II. Specificaties voor dit materiaal worden weergegeven in bijlage 3.2.

3.2.2. Reagentia

De reagentia voor LAMP zijn de LAMP Human DPD Deficiency Kit van LaCar, de DNA stalen en Milli-Q water. De kit bevat lysis buffer, negatieve controle, positieve controle en 4 reactiebuffers voor de 4 te analyseren varianten. Specificaties voor de reagentia worden weergegeven in bijlage 3.2.

3.2.3. Methode

Allereerst moeten de DNA stalen verdund worden tot een concentratie van ongeveer 20 ng/µl. Vervolgens wordt in een PCR-strip telkens 200 µl lysis buffer en 1 µl DNA staal gepipetteerd. De LaCar kit bevat ook een positieve en een negatieve controle. De positieve controle bestaat uit een mix van plasmiden die telkens heterozygoot mutant zijn voor de variant. Met deze controle willen we achterhalen hoe efficiënt de

methode is en of de kwaliteit van de reagentia voldoende is. De negatieve controle bestaat uit PCR grade water en is bedoeld om contaminatie op te sporen. Deze controles ondergaan hetzelfde proces als de DNA stalen en worden dus ook samen met de lysis buffer gepipetteerd in een PCR-strip. Na een incubatie van 10 minuten wordt de wellplaat voorbereid. Hierbij wordt 8 µl reactiebuffer en 2 µl DNA staal of controle in lysis buffer toegevoegd aan een 384-wellplaat en goed geresuspendeerd. De reactiebuffers zijn specifiek voor elke variant dus per staal en controle worden vier assays uitgevoerd met telkens een andere buffer. Deze buffers bevatten 6 primers die telkens in de omgeving van de genetische variant binden. Zo wordt het gewenste fragment geamplificeerd. Na het pipetteren, wordt de plaat geseald en wordt het LAMP protocol uitgevoerd. Dit kan d.m.v. twee toestellen namelijk de Lightcycler 480 II en de Quantstudio 5. Specificaties van de analyses op beide toestellen worden weergegeven in tabel 3.5 en 3.6.

Tabel 3.5: Procedure LAMP in Lightcycler 480 II

Kwantificatie

Temperatuur (°C)	Acquisition mode	Tijd (uu:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)	Aantal cycli
65	None	00:00:01	4,40	70
65	Single	00:00:22	4,40	

Smeltcurve

Temperatuur (°C)	Acquisition mode	Tijd (uu:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
90	None	00:00:02	4,4	/
40	None	00:00:20	1,0	/
80	Continuous	/	0,14	2
40	None	00:00:01	2,2	/

Tabel 3.6: Procedure LAMP in Quantstudio 5

Kwantificatie

Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)	Aantal cycli
65	00:01:00	1,6	30

Smeltcurve

Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)
90	00:00:02	1,6
35	00:10:00	0,8
90	00:00:01	0,1

3.3. TAQMAN SNP GENOTYPING ASSAYS

3.3.1. Materiaal

Voor het Taqman Assay wordt gebruik gemaakt van een Quantstudio 5, micropipetten, pipettips met filter, PCR-strips en een 384-wellplaat met bijhorende sealing folie. Specificaties van het materiaal worden weergegeven in bijlage 3.3.

3.3.2. Reagentia

De reagentia voor deze test zijn Taqman Genotyping Master Mix, Taqman Predesigned SNP Genotyping Assay, Taqman Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assay en Milli-Q water. Specificaties voor deze reagentia worden weergegeven in bijlage 3.3.

3.3.3. Methode

Allereerst moeten zowel de DNA stalen als de assays terug in suspensie worden gebracht. Dit gebeurt door de reagentia te vortexen en centrifugeren. Vervolgens worden de DNA stalen verdund. Om een goed resultaat te bekomen, is het belangrijk dat de stalen ongeveer tot eenzelfde concentratie worden verdund. Uiteindelijk moet er 1-20 ng DNA per well aanwezig zijn. Daarna kan de reactiemix worden aangemaakt bestaande uit de mastermix en het assay. Hiervoor moeten we eerst berekenen hoeveel volume nodig is voor alle stalen. Per staal moet een volume van 2,50 µl mastermix en 0,25 µl assay aanwezig zijn. Deze mix wordt dan gevortexd en gecentrifugeerd zodat er geen luchtballen meer aanwezig zijn. Na deze stap kan de plaat worden voorbereid. In elke well wordt 2,75 µl reactiemix en 2,25 µl DNA staal gepipetteerd. Uiteindelijk wordt de plaat geseald en gecentrifugeerd waarna de analyse op Quantstudio 5 volgt. Afhankelijk van welk assay wordt volbracht, zal de

analyse op het toestel verschillen. De mogelijkheden worden weergegeven in tabel 3.7. (38)

Tabel 3.7: Analyse van Taqman Assay in Quantstudio 5 (38)

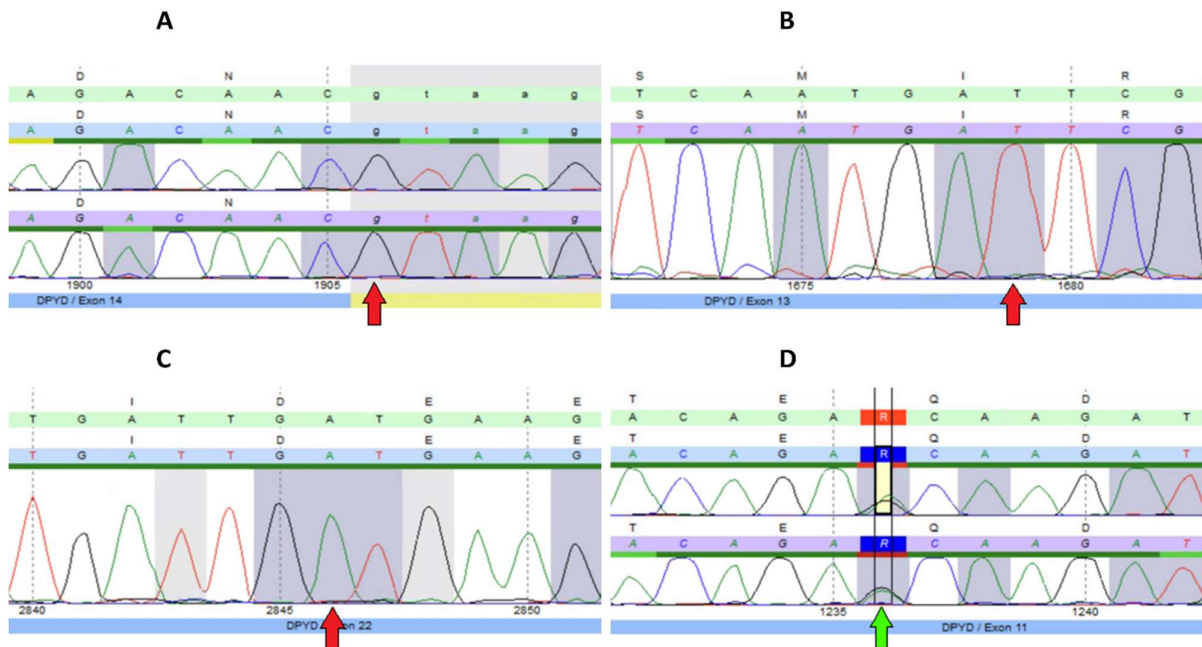
	Predesigned en Custom Taqman SNP Genotyping Assays			Taqman DME Genotyping Assays		
	Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Aantal cycli	Temperatuur (°C)	Tijd (uu:mm:ss)	Aantal cycli
Activatie Polymerase	95	00:10:00	HOLD	95	00:10:00	HOLD
Denaturatie	95	00:00:15	40	95	00:00:15	50
Annealing	60	00:01:00		60	00:01:30	

4. RESULTATEN

4.1. INTERPRETATIE GRAFIEKEN

In dit onderzoek werden verscheidene stalen geanalyseerd d.m.v. Sanger sequenering, LAMP analyse en Taqman Assays. In deze sectie, worden de bijhorende grafieken weergegeven van een staal met variant NM_000110.4(DPYD):c.1236G>A (p.Glu412=). In bijlage 4.1 worden ook de rapporten weergegeven voor deze analyse. Omwille van tijdsgebrek en de hoge kostprijs, werd de Taqman Assay enkel geëvalueerd voor de assays 1905+1G>A en 1236G>A. Vanwege de privacywetgeving, worden de stalen niet benoemd maar weergegeven met een nummer.

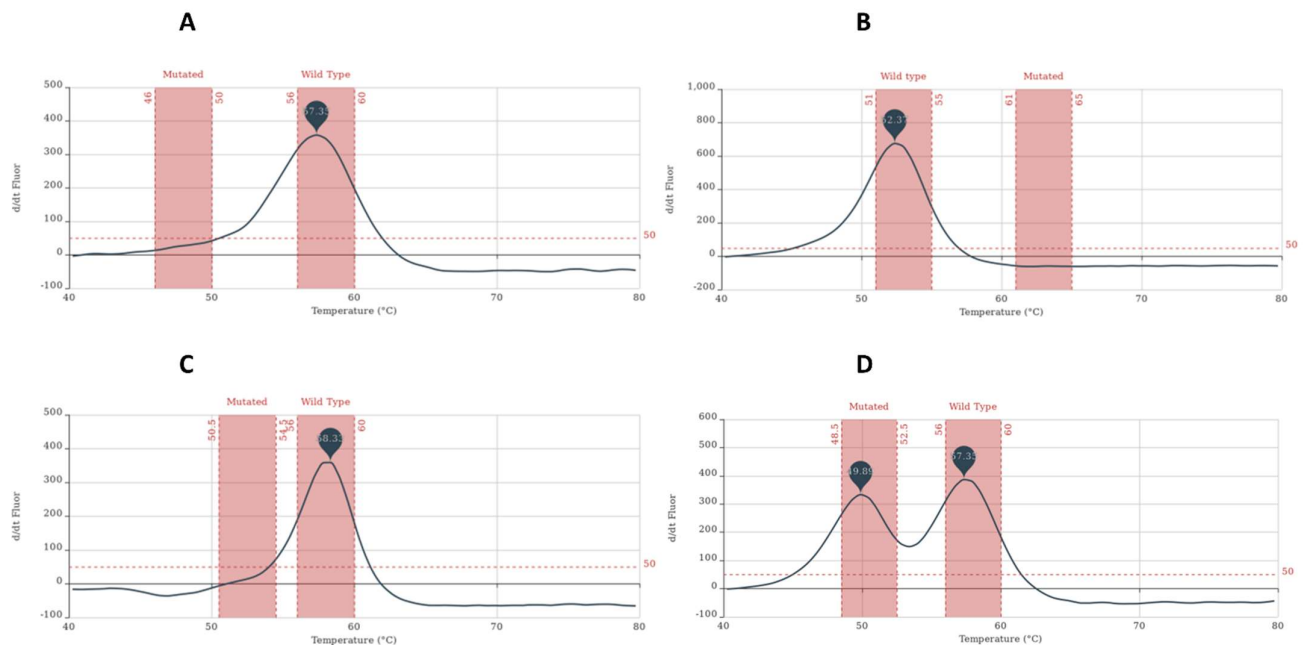
Sanger sequencering



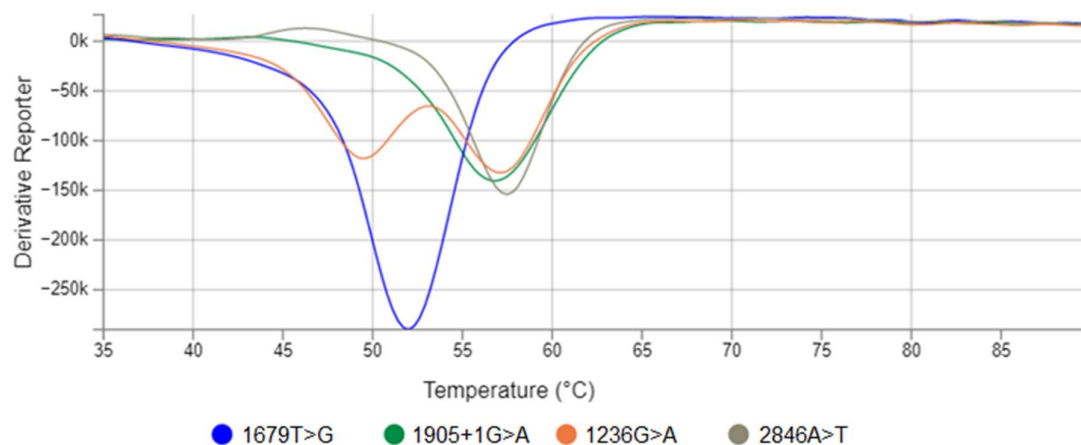
Figuur 4.1: Sequentieprofielen voor de detectie van 1905+1G>A (A), 1679T>G (B), 2846A>T (C) en 1236G>A (D) in SeqPilot software.

Na Sanger sequencering worden de sequentieprofielen gevisualiseerd door middel van SeqPilot. Deze profielen worden dan vergeleken met een referentiesequentie. De visualisatie van deze sequenties is mogelijk door de fluorescent gelabelde ddNTP's. Elk ddNTP heeft een andere fluorescente merker wat leidt tot de vier verschillende kleuren in het profiel. Per variant wordt steeds het bijhorend exon en de flankerende intronen gesequeneerd met zowel een forward-primer als een reverse-primer. Bij de analyse voor de varianten 1679T>G en 2846A>T worden enkel de sequenceringsresultaten van de forward-primer weergegeven omdat de resultaten, gegenereerd door middel van de reverse primer, onvoldoende kwalitatief waren. Er zijn verschillende redenen waarom niet kwalitatieve data wordt verkregen, zoals contaminatie en onnauwkeurig pipetteren. Dit is geen ernstig probleem aangezien de aanwezigheid van de variant bepaald kan worden door middel van de sequenceringsresultaten van de reverse-primer. Op figuur D worden twee verschillende pieken weergegeven op dezelfde positie. De pieken zijn representatief voor de nucleotides A en G. Uit de referentiesequentie kan worden afgeleid dat het nucleotide G afkomstig is van het wildtype allel terwijl nucleotide A aanwezig is in het mutante allel. De combinatie van beide allelen wordt in de sequentie voorgesteld door de letter R. Uit resultaat D kan dus worden afgeleid dat de patiënt heterozygoot is voor de variant 1236G>A.

LAMP analyse



Figuur 4.2: Smeltcurves voor de detectie van 1905+1G>A (A), 1679T>G (B), 2846A>T (C) en 1236G>A (D) in Genefox software

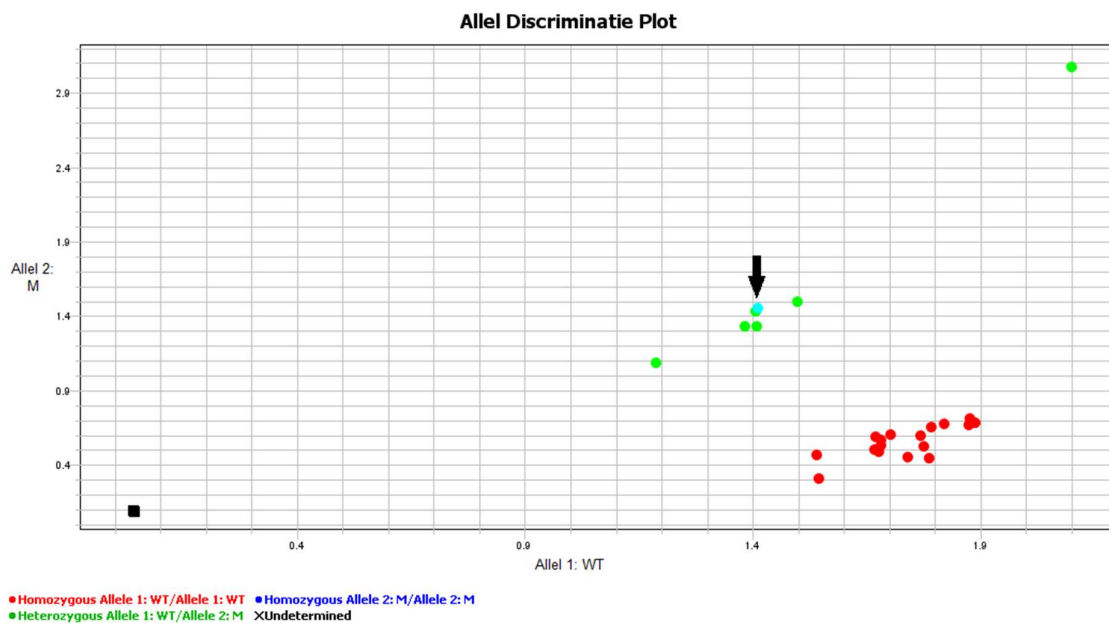


Figuur 4.3: Smeltcurves voor de detectie van 1905+1G>A (A), 1679T>G (B), 2846A>T (C) en 1236G>A (D) in Quantstudio software

Bij de LAMP analyse hebben we twee qPCR toestellen, Lightcycler 480 II en Quantstudio 5, met elkaar vergeleken om na te gaan of deze even performant zijn en correcte resultaten geven. De data van beide toestellen kan worden geanalyseerd in Genefox. Daarnaast kunnen de smeltcurves ook gegenereerd worden door de software van de Lightcycler en de Quantstudio zelf. De smeltcurves, verkregen door Genefox en Quantstudio, worden weergegeven in figuur 4.2 en 4.3. Beide analyses

resulteren in een smeltcurve waarbij de fluorescentiegraad wordt weergegeven in functie van de temperatuur. Bij curve D zien we dat er een piek bij mutant en een piek bij wildtype aanwezig is. Dit betekent dat het gen bestaat uit een wildtype allel en een mutant allel en dus heterozygoot mutant is voor 1236G>A. Deze bevinding komt overeen met het resultaat van de Sanger sequencer. Bij de andere curves zien we telkens slechts een piek bij wildtype wat betekent dat het wildtype allel homozygoot aanwezig is.

Taqman SNP Predesigned Genotyping Assay



Figuur 4.4: Scatterplot van alle stalen in Quantstudio software

De laatste techniek die werd getest in dit onderzoek is het Taqman SNP Genotyping Assay. Deze analyse werd enkel uitgevoerd voor de assays 1905+1G>A en 1236G>A. Op figuur 4.7 wordt het allel discriminatieplot weergegeven voor de 23 stalen. Deze stalen zijn reeds eerder getest via Sanger sequencer en LAMP analyse. Deze grafiek werd bekomen door het Taqman Predesigned Genotyping Assay voor 1236G>A te analyseren m.b.v. Quantstudio 5 en de bijhorende software. In de x-as wordt de fluorescentiegraad weergegeven van het VIC™ fluorofoor dat geassocieerd is met het wildtype allel. In de y-as wordt ook de fluorescentie weergegeven maar van het FAM™ fluorofoor dat bindt op het mutante allel. Als de punten aanwezig zijn links onderaan, betekent dit dat er noch een wildtype allel noch een mutant allel aanwezig is. De reden hiervoor is mogelijks een mislukte amplificatie of de analyse van een negatieve

controle waar geen DNA in zit. In deze test werden twee negatieve controles geïmplementeerd. Aangezien deze controles enkel water bevatten, wordt geen fluorescentie verwacht. Wanneer de punten aanwezig zijn rechts onderaan, zullen de stalen enkel het wildtype allel bevatten en dus geen variant. De groep in de rechterbovenhoek van het scatterplot heeft zowel een signaal voor het wildtype allel als voor het mutante allel. Dit betekent dat deze stalen heterozygoot mutant zijn. In de linkerbovenhoek worden normaal gezien de stalen weergegeven die homozygoot mutant zijn. In deze selectie zaten echter geen homozygoot mutante stalen dus het is niet getest of dit een correct resultaat zou opleveren. We zien echter wel dat een mooi resultaat wordt bekomen met deze stalen. De stalen met hetzelfde genotype clusteren samen waardoor het mogelijk is om de verschillende genotypes goed te differentiëren. De negatieve controles worden links onderaan weergegeven en de positieve controle rechts bovenaan zoals verwacht. Uit de twee vorige analyses, konden we afleiden dat het voorbeeldstaal heterozygoot mutant is voor de variant 1236G>A. Dit assay bevestigt het resultaat nogmaals aangezien het punt rechts bovenaan wordt weergegeven.

4.2. VALIDATIE TESTEN

In tabel 4.1 worden enkele resultaten opgesomd die belangrijk zijn voor de validatie van de LAMP Human DPD Deficiency Kit en de Taqman Assays. Zoals reeds eerder vermeldt, werden in dit onderzoek enkel de Taqman Assays voor 1905+1G>A en 1236G>A getest. De bekomen resultaten worden vergeleken met de varianten die gevonden zijn via Sanger sequencering. We hebben in totaal 34 stalen geanalyseerd. Hiervan werden 23 stalen recent geanalyseerd. Op de overige 11 stalen was reeds een analyse in het CMGG uitgevoerd waarvan de data ter beschikking werd gesteld. De verkregen data van alle stalen werd dan opgeladen in de software om de gewenste grafieken te bekomen. De resultaten van alle geanalyseerde stalen worden weergegeven in bijlage 4.2.

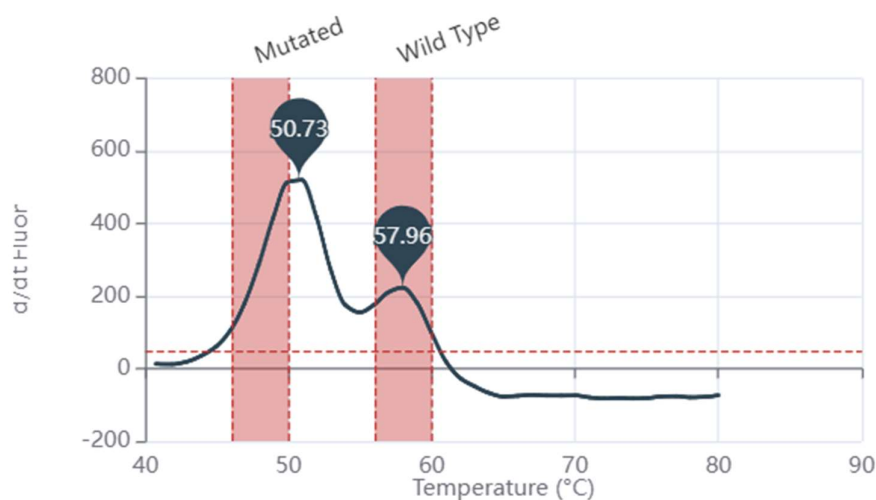
Tabel 4.1: Validatie van de LAMP Human DPD Deficiency Kit en de Taqman Assays ^a

DNA staal	Sanger sequencering	LAMP Human DPD Deficiency Kit	Taqman SNP Genotyping Assays
Leuven-1	1905C>G	Abnormaal voor 1905+1G>A	
Leuven-2	1905C>T	Abnormaal voor 1905+1G>A	
Leuven-3	1229G>A	Abnormaal voor 1236G>A	
Leuven-4	1218G>A	WT	
Leuven-5	2843T>C	2846A>T (het)	
1	2846A>T 1905+1G>A	2846A>T (het) 1905+1G>A (het)	
2	1236G>A	1236G>A (het)	1236G>A (het)
3	1905+1G>A	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)
4	1679T>G	1679T>G (hom)	
5	2846A>T	2846A>T (het)	
6	1905+17A>G	WT	
7	1280T>C 85T>C 1129-15T>C 1896T>C 496A>G 1627A>G	WT	
8	WT	WT	

^a heterozygoot (het), homozygoot (hom)

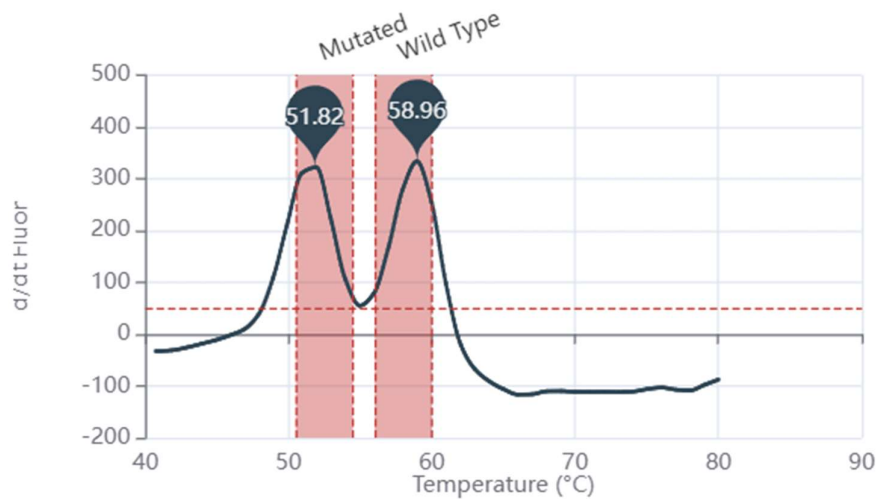
De eerste drie stalen, afkomstig uit Leuven, vertonen een afwijkende smelttemperatuur bij de analyse met de LAMP kit. Dit komt doordat er telkens een SNV onder de probe ligt. Deze stalen werden geselecteerd om na te gaan of een vals positief resultaat wordt bekomen door een SNV onder de probe. De afwijkende smeltcurve toont aan dat bij de LAMP analyse een onderscheid kan worden gemaakt tussen een erkende *DPYD* variant en een SNV. Op figuur 4.5 wordt de smeltcurve van Leuven-1 afgebeeld.

Hierop wordt duidelijk weergegeven dat de piek van deze curve op de grens ligt van het interval voor een mutant allel. Dit komt doordat het SNV 1905C>G slechts een nucleotide verwijderd is van de variant 1905+1G>A. De LAMP analyse vertoont dus een hoge specificiteit voor dit assay.



Figuur 4.5: Smeltcurve van staal Leuven-1 voor de detectie van 1905+1G>A in Genefox

Bij het staal Leuven-5 wordt een fout resultaat bekomen voor de LAMP analyse. Deze analyse geeft namelijk weer dat het staal heterozygoot is voor de variant 2846A>T terwijl in werkelijkheid, enkel de variant 2843T>C aanwezig is. Op figuur 4.6 is de smeltcurve, geanalyseerd door middel van de Genefox software, afgebeeld voor dit staal. Uit de curve kan worden afgeleid dat de piek in het mutant gebied afwijkt naar links en niet dezelfde smelttemperatuur heeft als andere stalen die wel heterozygoot mutant zijn. Deze piek heeft namelijk een smelttemperatuur van 51,82°C terwijl de andere stalen een smelttemperatuur vertonen van 52,95°C. De piek van 2843T>C ligt echter wel nog in het interval waardoor het een fout resultaat oplevert. Indien mogelijk, zou het bedrijf eventueel het interval kunnen verkleinen zodat dit probleem wordt opgelost. Deze variant is niet getest met een Taqman Assay dus het is onduidelijk of deze analyse wel kan discrimineren tussen beide genotypes. Het is zeker mogelijk dat het scatterplot ook niet correct zou zijn.

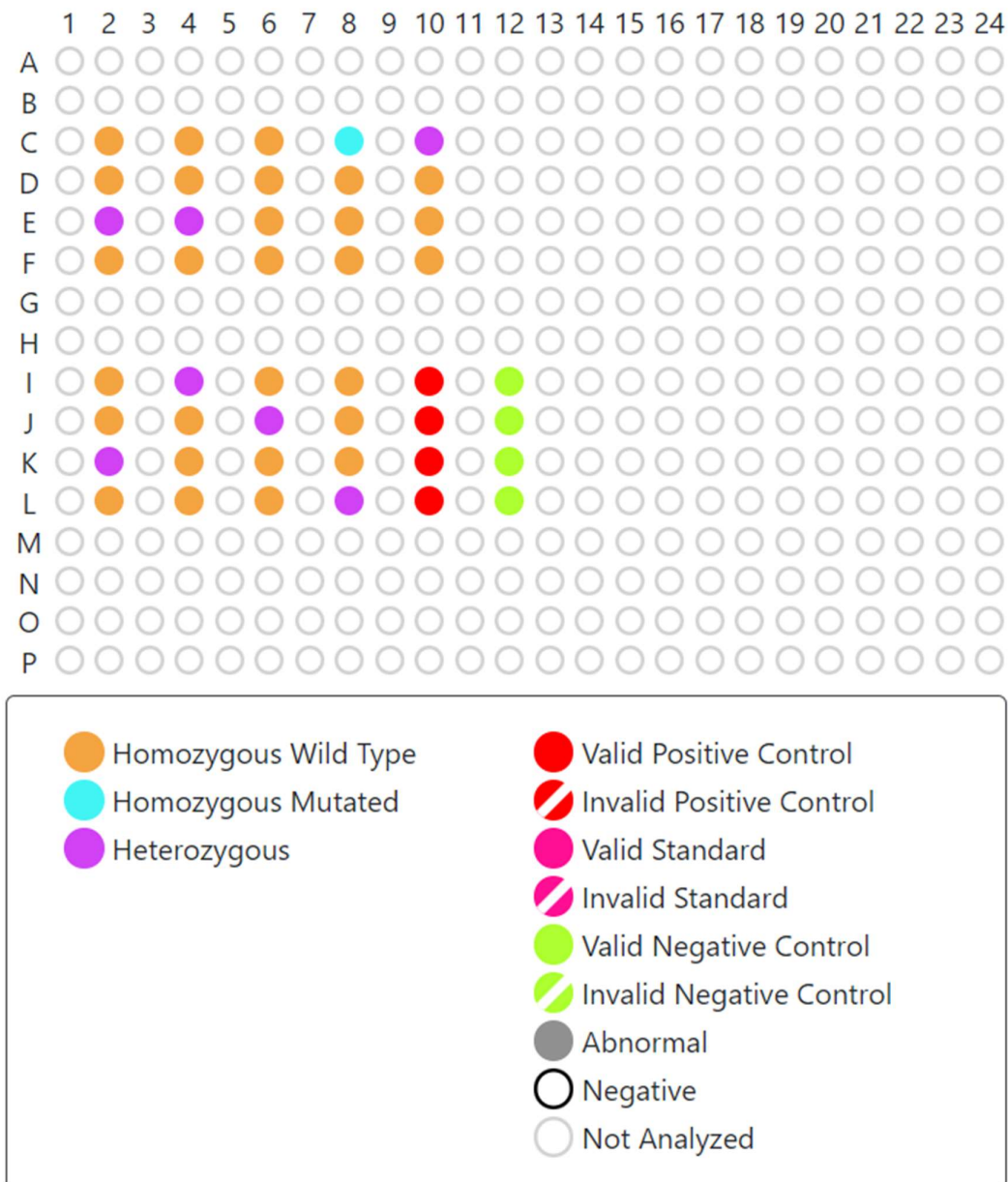


Figuur 4.6: Smeltcurve van staal Leuven-5 voor de detectie van 2846A>T in Genefox

Uit de resultaten van tabel 4.1 blijkt dat de LAMP technologie een hoge specificiteit en sensitiviteit heeft voor de vier varianten. Staal 4 wordt ook herkend als homozygoot door deze analyse. Het wordt ook bevestigd dat de varianten 1905+1G>A en 1236G>A worden herkend met de Taqman Assays. Het labo had echter geen homozygote stalen voor de geanalyseerde varianten waardoor we niet weten of de Taqman Assays een homozygoot staal correct kunnen benoemen. Vervolgens werden nog enkele stalen geïncubeerd met SNP's en een staal met een normale sequentie. Deze stalen worden correct bestempeld als WT door de LAMP analyse.

Voor de LAMP analyse zijn twee toestellen ter beschikking in het CMGG. Zowel de Lightcycler 480 II als de Quantstudio 5 zorgen voor kwalitatieve data en zijn eenvoudig in gebruik. Beide analyses leiden ook tot dezelfde smeltcurves in Genefox.

Uit de resultaten blijkt dat de meeste varianten correct worden geanalyseerd en mooi worden weergegeven in de smeltcurves bij de LAMP analyse. In Genefox wordt het resultaat niet enkel door de smeltcurves geïllustreerd maar ook reeds in de lay-out van de plaat. Dit zorgt ervoor dat we meteen een overzichtelijke weergave krijgen van het genotype van elk staal. In Genefox kan je ook van ieder staal apart een rapport genereren met de 4 verschillende genotypes, waardoor je voor iedere patiënt een overzichtelijk rapport krijgt. Een voorbeeld van de lay-out met de bijhorende legende wordt weergegeven in figuur 4.7.



Figuur 4.7: Lay-out van plaat in Genefox met bijhorende legende

4.3. KOSTENANALYSE

Voor de analyse van deze drie technieken werd ook een evaluatie van de kostprijs uitgevoerd. Dit werd onderverdeeld in twee categorieën namelijk de kost van de producten en van het personeel. Voor de producten werd telkens de inkoopprijs weergegeven en de prijs per staal. Materiaal zoals pipetten, pipettips en wellplaten werd samengevoegd onder de benaming 'plastics'. De kost hiervoor is ongeveer € 1. De kostprijs van de toestellen en van het Milli-Q water werd niet meegerekend in deze analyse. Het bedrag dat wordt uitgegeven aan personeel werd berekend o.b.v. aantal minuten verrichte arbeid. Deze analyse is zeer belangrijk aangezien de kosten voor de verschillende testen hoog kunnen oplopen.

4.3.1. Sanger sequencer

De kostprijs voor de reagentia per staal is het goedkoopst bij de Sanger sequencer. Dit komt mede door de korting die is verkregen voor zowel de Cycle Sequencing kit als de CleanDTR beads. Beide werden aangekocht met een korting van respectievelijk 38% en 35%. De aankoopprijs is hoog aangezien de producten in grote volumes worden aangekocht.

Tabel 4.2: Kostenanalyse producten

	Prijs (reagentia of kit)	Prijs per staal
TE buffer 1x, pH 8 (10 ml)	€ 0,01	€ 0,01
Forward -en reverse primers	€ 0,04	€ 0,04
KAPA2G Robust Hotstart Readymix (6,25 ml)	€ 267,00	€ 0,85
Antarctic phosphatase 5000U/ml (1000 µl)	€ 361,79	€ 0,29
Exonuclease I 3000 U/ml (150 µl)	€ 90,75	€ 0,12
BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit (5000 reacties)	€ 34.844,00	€ 1,74
M13 primers (100 nm)	€ 0,01	€ 0,01
CleanDTR beads (500 ml)	€ 7.597,01	€ 0,61
Ethanol absolute (2,5 L)	€ 155,57	€ 0,03
Plastics (pipetten, epjes,...)	€ 1,00	€ 1,00
Totaal	€ 43.317,18	€ 4,71

De kostprijs voor het personeel is het hoogst bij Sanger sequencing aangezien de analyse het meeste tijd vergt. Bij deze analyse worden de wachttijden echter nog niet meegerekend. Bij Sanger sequencing worden namelijk verschillende incubatiestappen uitgevoerd en de resultaten zijn vaak pas de dag na de analyse beschikbaar.

Tabel 4.3: Kostenanalyse personeel o.b.v. aantal minuten arbeid

	MLT ^a	Adjunct-laboratorium verantwoordelijke	Laboratorium verantwoordelijke	Kosten
Nakijken aanvraagformulier		1,5	1,5	€ 2,33
Administratie pre-analytische fase	3			€ 1,66
Analytische fase	20			€ 11,07
Post-analytische fase	3			€ 1,66
Rapportering in Glms	6			€ 3,31
Validatie in Glms		2	3	€ 3,97
Totaal	32	3,5	4,5	€ 24,00

^a MLT = Medisch laboratoriumtechnoloog

Bij het overzicht van de kostenanalyse voor Sanger sequencing, zien we dat er extra kosten bijkomen voor de DNA-extractie en GSU. Het GSU-team is verantwoordelijk voor het bedienen van de sequencers en het verwerken van de resultaten zodat deze geïnterpreteerd kunnen worden.

Tabel 4.4: Overzicht kosten

	DNA-extractie	Sanger sequencing	GSU	Totaal
Personeel	€ 4,22	€ 24,00	€ 0,18	€ 28,40
Reagentia	€ 5,29	€ 4,71	€ 1,03	€ 11,03
Totale kost voor analyse	€ 9,51	€ 28,71	€ 1,21	€ 39,43

4.3.2. LAMP Human DPD Deficiency Kit

Bij de LAMP analyse moet enkel de LAMP kit van LaCar aangekocht worden samen met eerder vermelde plastics zoals pipettips en Lightcycler 384-wellplaten. Met de LAMP kit kunnen ongeveer 24 reacties worden uitgevoerd. Dit aantal slaat echter op het gebruik van een 96-wellplaat. In dit onderzoek wordt een 384-wellplaat gebruikt waardoor het nodige volume lager ligt. Bij een 94-wellplaat wordt telkens 20 µl mastermix toegevoegd terwijl slechts 8 µl wordt toegevoegd aan een 384-wellplaat. Wanneer we dit omrekenen, komen we uit op een totaal van 60 reacties per kit. Een reactie betekent hier de analyse van een staal voor de vier assays.

Tabel 4.5: Kostenanalyse producten

	Prijs (reagentia of kit)	Prijs per staal
LaCar kit (60 reacties)	€ 532,56	€ 8,88
Plastics	€ 1,00	€ 1,00
Totaal	€ 533,56	€ 9,88

De LAMP analyse vergt het minste arbeid van alle technieken. Dit vertaald zich in de kostprijs voor het personeel. Zowel de hands-on tijd als de wachttijd is zeer kort voor deze analyse.

Tabel 4.6: Kostenanalyse personeel o.b.v. aantal minuten arbeid

	MLT ^a	Adjunct-laboratorium verantwoordelijke	Laboratorium verantwoordelijke	Kosten
Nakijken aanvraagformulier		1,5	1,5	€ 2,33
Administratie pre-analytische fase	3			€ 1,66
Analytische fase	8			€ 4,43
Post-analytische fase	3			€ 1,66
Rapportering in Glms	6			€ 3,31
Validatie in Glms		2	3	€ 3,97
Totaal	20	3,5	4,5	€ 17,36

^a MLT = Medisch laboratoriumtechnoloog

De LAMP analyse is volgens deze kostenanalyse een relatief goedkope methode. De analyse kan eventueel ook op een bloedstaal worden uitgevoerd waardoor de kost voor DNA-extractie wordt geëlimineerd.

Tabel 4.7: Overzicht kosten

	DNA-extractie	LAMP analyse	Totaal
Personeel	€ 4,22	€ 17,36	€ 21,58
Reagentia	€ 5,29	€ 9,88	€ 15,17
Totale kost voor analyse	€ 9,51	€ 27,24	€ 36,75

4.3.3. Taqman SNP Genotyping Assays

Een significant nadeel van deze test is de prijs van de assays. De Taqman Assays zijn zeer duur. Dit komt voornamelijk doordat voor elke variant een assay moet worden aangekocht. In tabel 4.8, zien we dat de variant 1236G>A een Predesigned Assay heeft terwijl de drie ander varianten elk een DME Assay hebben.

Tabel 4.8: Kostenanalyse producten

	Prijs (reagentia of kit)	Prijs per staal
Taqman Genotyping Master Mix (1 ml)	€ 132,00	€ 1,45
Taqman Predesigned SNP Genotyping Assay 40x (300 reacties)	€ 508,00	€ 1,69 (1236G>A)
Taqman DME Genotyping Assay (150 reacties)	€ 1.626,00	€ 10,84 (1905+1G>A) (2846A>T) (1679T>G)
Plastics	€ 1,00	€ 1,00
Totaal	€ 2.881,00	€ 14,99

Ook de hands-on tijd voor deze techniek is aan de hogere kant. Dit is voornamelijk het gevolg van de twee verschillende assays. Beide assays hebben namelijk een verschillende doorlooptijd op Quantstudio 5 waardoor ze apart moeten worden voorbereid. Hierdoor duurt de post-analytische fase ook langer aangezien de twee bekomen datafiles apart worden geanalyseerd in de software.

Tabel 4.9: Kostenanalyse personeel o.b.v. aantal minuten arbeid

	MLT ^a	Adjunct-laboratorium verantwoordelijke	Laboratorium verantwoordelijke	Kosten
Nakijken aanvraagformulier		1,5	1,5	€ 2,33
Administratie pre-analytische fase	3			€ 1,66
Analytische fase	15			€ 8,30
Post-analytische fase	6			€ 3,31
Rapportering in Glms	6			€ 3,31
Validatie in Glms		2	3	€ 3,97
Totaal	30	3,5	4,5	€ 22,88

^a MLT = Medisch laboratoriumtechnoloog

De kostprijs voor de Taqman Assays ligt duidelijk hoger dan de kostprijs voor Sanger sequenering of LAMP analyse. Dit is vooral te wijten aan de dure assays en het verschil tussen de analyse van de Predesigned Assays en de DME Assays.

Tabel 4.10: Overzicht kosten

	DNA-extractie	Taqman Assay	Totaal
Personeel	€ 4,22	€ 22,88	€ 27,10
Reagentia	€ 5,29	€ 14,99	€ 20,28
Totale kost voor analyse	€ 9,51	€ 37,87	€ 47,38

5. DISCUSSIE

Allereerst moet worden nagegaan of het testen voor een DPD deficiëntie bij de behandeling met een fluoropyrimidine een meerwaarde biedt in de praktijk. Uit een eerder onderzoek (de With et al., 2023) blijkt dat de pre-therapeutische genotypering gevolgd door een eventuele dosisaanpassing leidt tot een betere patiëntveiligheid. Sinds de invoer van de European Medicines Agency (EMA) richtlijnen in 2020, wordt een stijging gezien in de implementatie van zowel genotypering als fenotypering voor het nagaan van DPD deficiëntie in Europa. Terugbetaling van de testen en duidelijke klinische richtlijnen worden beschouwd als de belangrijkste factoren voor een succesvolle implementatie. De mate van terugbetaling varieert sterk in de Europese landen. In België wordt de genotypering voor *DPYD* terugbetaald maar de fenotypering voor DPD niet. Verschillende richtlijnen ontstonden na de publicatie van het EMA. De CPIC richtlijnen worden het meest gebruikt in Europa. Gebrek aan kennis over farmacogenetische testen bij medisch personeel is echter nog een groot werkpunt. In het algemeen zien we dat het testen voor een DPD deficiëntie een meerwaarde biedt waardoor de implementatie ervan is gestegen. (39)

In dit onderzoek werden drie methoden voor de genotypering van het *DPYD* gen getest. Een DPD deficiëntie kan ook worden achterhaald via fenotypering van de enzymactiviteit. Deze techniek heeft een hoge sensitiviteit en is onafhankelijk van de etniciteit van de patiënt. Een daling in enzymactiviteit kan het gevolg zijn van een functionele variant. Dit kan vervolgens via genotypering worden ontdekt. Een genetische oorzaak echter niet altijd aan de basis van een wijziging in enzymactiviteit. De enzymactiviteit kan ook dalen door bijvoorbeeld comediatie. Dit kan niet worden ontdekt d.m.v. genotypering maar wel door fenotypering. Een voorbeeld hiervan is de combinatie van het fluoropyrimidine, Tegafur, met Uracil of Gimeracil. Zowel Uracil als Gimeracil zorgen voor een verminderde afbraak van Tegafur door DPD te inhiberen. Deze inhibitie kan worden vastgesteld door fenotypering. Desondanks wordt het gebruik van Tegafur afgeraden door het gebrek aan kennis over het gecombineerd effect van een DPD inhibitie en een *DPYD* variant. Fenotypering heeft echter ook significante nadelen. De analyse wordt namelijk niet terugbetaald door de ziekteverzekering in België waardoor de kostprijs voor de patiënt kan oplopen tot € 45. Daarnaast zijn de pre-analytische condities voor de bloedstalen zeer strikt. Dit komt vooral doordat het uracilgehalte in een bloedstaal sterk stijgt bij kamertemperatuur.

Een staal moet bijvoorbeeld gecentrifugeerd worden bij 4°C waarna het plasma meteen moet worden ingevroren. Dit proces mag maximaal 90 minuten duren. Een plasmastaal moet namelijk continu bewaard worden in -20°C. Dit is een extra moeilijkheid bij het transport van de stalen. Om deze redenen wordt de fenotypering nog maar zelden uitgevoerd in het UZ Gent om een DPD deficiëntie te achterhalen.

Een standaardtechniek voor genotypering is Sanger sequencing. Dit is ook de huidige technologie die binnen het CMGG gebruikt wordt voor de analyse van *DPYD*. Een voordeel van Sanger sequencing is dat het telkens de exonen en omliggende intronen van de vier beoogde varianten sequeneert. Andere varianten in deze sequentie kunnen zo ook worden gedetecteerd. Dit is een meerwaarde op lange termijn. Toekomstig onderzoek kan immers leiden tot nieuwe ontdekkingen m.b.t. de functionaliteit van deze varianten. Het uitvoeren van Sanger sequencing heeft echter ook minpunten. Een belangrijk nadeel is de tijdsduur van de analyse. Uit de kostenanalyse blijkt dat Sanger sequencing per staal 12 minuten langer duurt dan de LAMP analyse. De analyse is echter gebaseerd op het aantal minuten verrichte arbeid en houdt geen rekening met de vele wachttijden tijdens Sanger sequencing. De verschillende programma's op de thermal cycler genaamd KAPA, EXO_AP en SEQUENCING duren ongeveer 50, 55 en 70 minuten. Daarnaast worden meerdere analyses uitgevoerd op de capillaire sequencer, waardoor de resultaten van de analyse pas een dag later beschikbaar zijn. De tijdspanne tussen het afgeven van een staal aan het labo en het verkrijgen van de resultaten zal dus hoger zijn voor de sequencing dan voor de LAMP analyse. Dit is van groot belang aangezien de *DPYD* analyse wordt gebruikt voor de dosering van een chemotherapeutikum. Het doel is om de kankerbehandeling van de patiënt zo snel mogelijk te starten. Ook wat betreft de totale kost, is deze techniek duurder dan de LAMP analyse. Daarnaast is de voorbereiding voor deze analyse zeer complex wat resulteert in een grotere kans op fouten. De uitvoering bestaat namelijk uit verschillende stappen en meerdere reagentia zijn hierbij betrokken. Voor deze methode zijn ook meer plastics, zoals wellplaten en pipettips, nodig. Het is dus zeker een meerwaarde om een techniek te vinden die milieuvriendelijker is.

De focus van dit onderzoek ligt voornamelijk bij het testen van de LAMP Human DPD Deficiency kit van LaCar. LAMP is een zeer snelle amplificatiemethode. Dit betekent

dat we met deze analyse op een korte tijd, een grote hoeveelheid DNA-fragmenten verkrijgen. De techniek slaagt erin om de vier varianten correct te detecteren. Ook wanneer een SNV onder de probe ligt, heeft dit meestal geen invloed op de detectie van de variant. Een uitzondering hierop is het SNV 2843T>C in het *DPYD* gen. Deze SNV ligt onder de probe en kan beschouwd worden als variant 2846A>T wegens kruisreactiviteit. Deze kruisreactie vertoont een frequentie van 0,0004% in de Genome Aggregation Database. In een vorig onderzoek (van Kuilenburg et al.,2016) werd een DPD activiteit van slechts 30% vastgesteld bij een aantal patiënten met de variant 2843T>C. Deze variant werd toen gedetecteerd in de Nederlandse populatie. Het is niet mogelijk om het interval van de LAMP analyse voor assay 2846A>T te verkleinen aangezien de smelttemperatuur run afhankelijk is. Er moet dus rekening worden gehouden met de interrunc variabiliteit. Een ander voordeel van de LAMP analyse is dat deze zowel op een DNA staal als een bloedstaal kan worden uitgevoerd in tegenstelling tot de andere technieken. Dit zorgt ervoor dat de doorlooptijd van de analyse kan worden ingekort. Daarnaast wordt de amplificatie uitgevoerd bij eenzelfde temperatuur waardoor geen thermal cycler nodig is. Nadien wordt ook geen gelelektroforese meer uitgevoerd d.m.v. de fragment analyzer. Dit heeft dus als voordeel dat je als labo minder toestellen moet voorzien wat leidt tot een reductie van de kost voor het labo. Dit betekent ook dat de LAMP analyse niet afhankelijk is van het schema en de bezetting van deze toestellen binnen het labo. De LAMP analyse kan dus beschouwd worden als een zeer flexibele techniek waarbij de tijdsduur van zowel de analyse zelf als het verkrijgen van de resultaten korter is dan bij Sanger sequencing. De kostprijs voor deze methode is ook de laagste binnen dit onderzoek. Bovendien vereist de voorbereiding veel minder materiaal. Het grote nadeel van deze techniek is dat het enkel de vier belangrijkste varianten detecteert. Andere SNV's, waarvan de functionaliteit nog onduidelijk is, worden niet bepaald via deze analyse. De informatie die dus wordt verkregen is beperkt. (40,41)

De genotypering van het *DPYD* gen kan ook worden uitgevoerd door gebruik te maken van de Taqman SNP Genotyping Assays van Thermo Fisher. Thermo Fisher beschikt over een grote database van varianten van verschillende genen waarvoor reeds assays zijn geproduceerd. Het is ook mogelijk om zelf een assay voor een specifieke variant samen te stellen online. Er zijn dus meer mogelijkheden in de toekomst bij Thermo Fisher in vergelijking met LaCar. Daarnaast werden de correcte resultaten

bekomen met de geteste assays. Over de Taqman Assays voor de varianten 2846A>T en 1679T>G van het *DPYD* gen kan geen uitspraak worden gedaan. In tabel 4.10 wordt de kostprijs weergegeven. Wanneer dit vergeleken wordt met de andere technieken, blijkt dat deze techniek de duurste is. Een van de redenen hiervoor is dat er vier verschillende assays moeten aangekocht worden. Voor de variant 1905+1G>A wordt een Taqman DME Genotyping Assay aangekocht. Voor de andere drie varianten wordt telkens een Taqman SNP Predesigned Assay gekocht. Deze kits zijn zeer duur. De Predesigned Assays kosten € 508 terwijl de kostprijs van een DME Assay € 542 bedraagt. Hierdoor stijgt de totale kostprijs voor de analyse. De voorbereiding vergt ook meer tijd aangezien de verschillende soorten assays een apart qPCR protocol hebben, waardoor je de assays na elkaar moet analyseren op Quantstudio 5 of je moet twee verschillende toestellen hebben om deze in parallel te kunnen lopen. Het Taqman DME Assay moet in een plaat en de drie Taqman Predesigned Assays kunnen samen in een andere plaat. Dit maakt de voorbereiding en de analyse ingewikkeld waardoor de kans op fouten groter is. De extra arbeid leidt ook tot een hogere kostprijs van het personeel.

De drie geteste technieken namelijk Sanger sequencing, LAMP analyse en Taqman Assay detecteren allemaal de variant 1236G>A. Deze variant is echter niet verantwoordelijk voor de gedaalde functie van het enzym. De verminderde functie is het gevolg van de variant 1129-5923C>G. De variant 1236G>A wordt gedetecteerd zodat ook andere varianten in het exon kunnen worden achterhaald. In de literatuur werd reeds bevestigd dat de detectie van 1236G>A voldoende is. Dit besluit werd bekomen door de bepaling van het linkage disequilibrium. Het linkage disequilibrium of koppelingsonevenwicht geeft de associatie weer van allelen op verschillende loci in de populatie. Hieruit kan de correlatie tussen 1236G>A en 1129-5923C>G worden afgeleid. Dit betekent dat de beide varianten telkens samen worden overgeërfd en de detectie van 1236G>A voldoende is. Via dit onderzoek werd dan nagegaan of we de variant 1236G>A correct kunnen bepalen wat het geval is voor de drie technieken. (42)

De rapportering van de drie technieken is zeer belangrijk voor de eventuele klinische implementatie. Bij Sanger sequencing wordt het rapport gegenereerd vanuit Seqpilot. Het rapport is zeer overzichtelijk en bevat de geselecteerde curves samen met de nodige informatie over de aanwezige variant. De LAMP analyse kan worden

uitgevoerd met twee toestellen namelijk de Lightcycler 480 II en de Quantstudio 5. Quantstudio 5 is een zeer eenvoudig toestel maar de resultaten van de analyse worden niet op het toestel zelf weergegeven. De data wordt eerst opgeladen in de Quantstudio software. In deze software wordt dan een Excel-bestand gegenereerd wat kan worden opgeladen in Genefox. Bij de Lightcycler kunnen de grafieken direct worden bekeken via de Lightcycler software. Zo kan snel worden nagegaan of er een fout is gebeurd tijdens de voorbereiding of analyse. Van hieruit wordt een XML-bestand gegenereerd dat kan worden opgeladen in Genefox. Genefox is een online analyseplatform ontwikkeld door LaCar. Iedereen kan een account aanmaken op dit platform waardoor het software pakket gemakkelijk beschikbaar is. De resultaten worden zeer overzichtelijk weergegeven in de smeltcurves maar ook in de lay-out van de plaat. De kleurencode van de lay-out, afgebeeld op figuur 4.7, geeft meteen weer of een bepaalde variant aanwezig is. Het is ook mogelijk om voor elke patiënt een apart rapport aan te maken in deze software. Een voorbeeld van dit rapport wordt weergegeven in bijlage 4.1. In het rapport worden de smeltcurves weergegeven samen met het resultaat voor elke variant. Een nadeel aan deze software is het gebrek aan extra informatie. Wanneer een smeltcurve als abnormaal wordt bestempeld, kan de oorzaak hiervan niet worden nagegaan. Dit is meestal het gevolg van een SNV die onder de probe ligt maar dit SNV wordt niet benoemd in de software. De LAMP analyse in de Quantstudio software verloopt op een gelijkaardige wijze. De structuur van de software is zeer overzichtelijk en de resultaten worden ook mooi weergegeven in de smeltcurves. Quantstudio wordt ook gebruikt om de resultaten van de Taqman Assays te analyseren. Hierbij wordt een scatterplot gegenereerd van alle stalen. De rapportering voor deze analyse is ondermaats t.o.v. de andere analyses. Allereerst is er geen mogelijkheid om een rapport te creëren per patiënt. Dit betekent dat het scatterplot met alle stalen telkens in het rapport staat samen met de bijhorende tabel met de resultaten van alle stalen. Uit het plot zelf kan ook niets worden afgeleid want het gewenste staal wordt er niet in aangeduid.

Uit dit onderzoek blijkt dat de implementatie van de LAMP Human DPD Deficiency Kit voor de genotypering van *DPYD* de beste keuze zou zijn. De analyse is het goedkoopst en neemt het minste tijd in beslag. Bovendien is de voorbereiding voor deze analyse zeer eenvoudig wat de kans op fouten beperkt. De software, Genefox, is ook zeer overzichtelijk en handig in gebruik. De rapporten, die door deze software worden

gegenereerd, ogen simpel maar bevatten alle nodige informatie om een conclusie te vormen over de aanwezige varianten. In het algemeen, is het echter onduidelijk of de LAMP analyse de beste keuze zou zijn op lange termijn. We moeten namelijk ook rekening houden met de evolutie van het farmacogenetisch onderzoeksgebied. Het nut van genetische testen is reeds bewezen voor verschillende geneesmiddel-gen interacties apart. Een volgende stap is mogelijks het implementeren van een farmacogenetisch panel. Dit werd onderzocht in de PREPARE studie. Uit deze studie bleek dat het testen van een panel van verschillende farmacogenen waaronder *DPYD* leidde tot minder bijwerkingen bij de behandeling. De implementatie van de test op grote schaal bleek ook klinisch relevant te zijn. De kans is dus reëel dat dit wordt geïntegreerd in het labo. Dan moeten er methoden ter beschikking zijn om deze test uit te voeren. In dit onderzoek, lijkt de LAMP analyse het minste potentieel te hebben op toekomstvlak. Het bedrijf LaCar heeft momenteel slechts vier genetische testen op de markt. De vier kits maken telkens gebruik van de LAMP analyse voor de detectie van varianten in vier verschillende genen. Het is mogelijk dat er meer testen volgen maar dit is afhankelijk van het toekomstperspectief van het bedrijf zelf. Thermo Fisher daarentegen beschikt over een database aan varianten waarvoor reeds assays zijn aangemaakt. Het is ook mogelijk om zelf een assay samen te stellen. Dit biedt veel mogelijkheden naar de toekomst toe. De nadelen die eerder werden beschreven gelden echter nog steeds. Het rapporteren van de resultaten per patiënt is o.a. een vereiste voor de klinische implementatie en mag dus niet ontbreken. Om fouten te vermijden in een diagnostisch laboratorium is het veel handiger wanneer de resultaten per patiënt worden weergegeven, wat niet mogelijk is voor de Taqman Assays. Bij Sanger sequencing wordt het te sequencen gebied bepaald door de keuze van primers. Deze techniek is dan ook niet beperkt tot een bepaald gen en detecteert alle varianten binnen een bepaald gebied. De kostprijs en duur van de analyse ligt ook lager dan bij de Taqman Assays en de rapportering gebeurt op een overzichtelijke manier via het Seqpilot programma. Sanger sequencing lijkt dus de beste optie voor het testen van een farmacogenetisch panel. Voor de genotypering van grote panels moet de techniek echter geschikt zijn om een groot gebied binnen het genoom te sequencen. Dit wordt eerder uitgevoerd door een NGS gebaseerde techniek. (8)

6. CONCLUSIE

In het algemeen worden de vier functionele varianten van het *DPYD* gen correct gedetecteerd door Sanger sequencer, LAMP analyse en Taqman Assays. Een SNV onder de probe wordt ook correct weergegeven door de LAMP analyse. In dit onderzoek werden enkel de varianten 1236G>A en 1905+1G>A getest met de Taqman Assays. Een verdere analyse van de varianten 2846A>T en 1679T>G is dus noodzakelijk voor de validatie van deze methode. De resultaten van de LAMP analyse worden zeer mooi gevisualiseerd in Genefox. Ook de rapportering in deze software is zeer overzichtelijk. Daarnaast kunnen zowel de Lightcycler 480 II als de Quantstudio 5 gebruikt worden voor de LAMP analyse. Deze analyse is ook de goedkoopste en neemt het minste tijd in beslag. Hieruit kan worden besloten dat de LAMP DPD Deficiency Kit van LaCar de beste keuze is voor de *DPYD* analyse. Voor de genotypering van een farmacogenetisch panel is een NGS gebaseerde techniek eerder aangeraden.

7. LITERATUURLIJST

1. Ishikawa T. Pharmacogenomics: current status and future prospectives. Vol. 63 Suppl 12, Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine. 2005. p. 50–6.
2. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC. Pharmacogenomics and Pharmacogenetics. In: Basic and Applied Aspects of Biotechnology. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 151–66.
3. Dere WH, Suto TS. The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in improving translational medicine. Clin Cases Miner Bone Metab. januari 2009;6(1):13–6.
4. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: Past, present and future. Vol. 16, Drug Discovery Today. 2011. p. 852–61.
5. McDonagh EM, Thorn CF, Bautista JM, Youngster I, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary. Pharmacogenet Genomics. maart 2012;22(3):219–28.
6. Bienfait K, Chhibber A, Marshall JC, Armstrong M, Cox C, Shaw PM, e.a. Current challenges and opportunities for pharmacogenomics: perspective of the Industry Pharmacogenomics Working Group (I-PWG). Hum Genet. 1 juni 2022;141(6):1165–73.
7. De Pauw A, Martinet W, Theuns D, Vandeven K, De Loof H. Farmacogenetische tests in de Belgische zorg: (hoe) beginnen we eraan?
8. Swen JJ, van der Wouden CH, Manson LE, Abdullah-Koolmees H, Blagec K, Blagus T, e.a. A 12-gene pharmacogenetic panel to prevent adverse drug reactions: an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised crossover implementation study. The Lancet. 4 februari 2023;401(10374):347–56.
9. Chenoweth MJ, Giacomini KM, Pirmohamed M, Hill SL, van Schaik RHN, Schwab M, e.a. Global Pharmacogenomics Within Precision Medicine: Challenges and Opportunities. Clin Pharmacol Ther. 1 januari 2020;107(1):57–61.
10. Bates SA. Chromosome [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Chromosome>
11. Adams D. Genotype [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/genotype>
12. Allele [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Allele>
13. Hanchard NA. Autosomal Recessive Disorder [Internet]. National Humane Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Autosomal-Recessive-Disorder>
14. Biesecker LG. Haplotype [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/haplotype>
15. Conneally PM. Human genetic polymorphisms. Dev Biol Stand. 1994;83:107–10.
16. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. Nat Rev Genet. augustus 2009;10(8):551–64.
17. Keats BJB, Sherman SL. Population Genetics. 2013.
18. Gunter C. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPS) [Internet]. National Human Genome Research Institute (NHGRI). 2023 [geciteerd 27 maart 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Single-Nucleotide-Polymorphisms>
19. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, Barbarino J, Schellens JHM, Swen JJ, e.a. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. Clin Pharmacol Ther. februari 2018;103(2):210–6.
20. Kocal GC, Baskin Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. In: Genetic Polymorphisms. InTech; 2017.
21. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, e.a. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. Hum Mutat

- [Internet]. 1 juni 2016 [geciteerd 29 mei 2023];37(6):564–9. Beschikbaar op: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/humu.22981>
22. Miteva-Marcheva NN, Ivanov HY, Dimitrov DK, Stoyanova VK. Application of pharmacogenetics in oncology. *Biomark Res.* 17 december 2020;8(1):32.
 23. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, e.a. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 29 december 2013;94(6):640–5.
 24. van Kuilenburg ABP, Meijer J, Meinsma R, Pérez-Dueñas B, Alders M, Bhuiyan ZA, e.a. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency: Homozygosity for an Extremely Rare Variant in DPYD due to Uniparental Isodisomy of Chromosome 1. In 2018. p. 65–9.
 25. Casneuf V, Borbath I, Van den Eynde M, Verheezen Y, Demey W, Verstraete AG, e.a. Joint Belgian recommendation on screening for DPD-deficiency in patients treated with 5-FU, capecitabine (and tegafur). *Acta Clin Belg.* 4 maart 2022;77(2):346–52.
 26. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* mei 2003;3(5):330–8.
 27. Capecitabine [Internet]. *Farmacotherapeutisch Kompas.* [geciteerd 3 april 2023]. Beschikbaar op: <https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/c/capecitabine>
 28. Tegafur/gimeracil/oteracil [Internet]. *Farmacotherapeutisch Kompas.* [geciteerd 3 april 2023]. Beschikbaar op: https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/t/tegafur_gimeracil_oteracil
 29. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics.* april 2011;21(4):237–42.
 30. García-Alfonso P, Saiz-Rodríguez M, Mondéjar R, Salazar J, Páez D, Borobia AM, e.a. Consensus of experts from the Spanish Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Society and the Spanish Society of Medical Oncology for the genotyping of DPYD in cancer patients who are candidates for treatment with fluoropyrimidines. *Clinical and Translational Oncology.* 13 maart 2022;24(3):483–94.
 31. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules.* 5 augustus 2008;13(8):1551–69.
 32. Donadio MDS, Carraro DM, Torrezan GT, Lopes de Mello CA. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) polymorphisms knocking on the door. *Ecancermedicalscience.* 17 januari 2022;16.
 33. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of dpyd variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 5 januari 2014;74(9):2545–54.
 34. Nie Q, Shrestha S, Tapper EE, Trogstad-Isaacson CS, Bouchonville KJ, Lee AM, e.a. Quantitative Contribution of rs75017182 to Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Splicing and Enzyme Activity. *Clin Pharmacol Ther.* 1 oktober 2017;102(4):662–70.
 35. Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, Wang K, Diasio RB. Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer Res.* 15 maart 2013;73(6):1958–68.
 36. Dahui Q. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med.* 1 februari 2019;16(1):4–10.
 37. Lamp Human DPD Deficiency Kit (4 Mutations) [Internet]. Beschikbaar op: www.lacar-mdx.com
 38. Fisher Scientific T. Single-tube assays for use with: TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays TaqMan® Drug Metabolism Enzyme Genotyping Assays TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays Publication Number MAN0009593 Revision B.0. 2017.
 39. de With M, Sadlon A, Cecchin E, Haufroid V, Thomas F, Joerger M, e.a. Implementation of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency testing in Europe. *ESMO Open.* april 2023;8(2):101197.
 40. Coenen MJH, Paulussen ADC, Breuer M, Lindhout M, Tserpelis DCJ, Steyls A, e.a. Evolution of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Diagnostic Testing in a Single Center during an 8-Year Period of Time. *Current Therapeutic Research.* 2019;90:1–7.

41. van Kuilenburg ABP, Meijer J, Maurer D, Dobritzsch D, Meinsma R, Los M, e.a. Severe fluoropyrimidine toxicity due to novel and rare DPYD missense mutations, deletion and genomic amplification affecting DPD activity and mRNA splicing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. maart 2017;1863(3):721–30.
42. LDlink | An Interactive Web Tool for Exploring Linkage Disequilibrium in Population Groups [Internet]. [geciteerd 29 mei 2023]. Beschikbaar op: https://ldlink.nih.gov/?var1=rs75017182&var2=rs56038477&pop=YRI%2BLWK%2BGWD%2BMSL%2BESN%2BASW%2BACB%2BML%2BPUR%2BCLM%2BPEL%2BCHB%2BJPT%2BCHS%2BCDX%2BKHV%2BCEU%2BTSI%2BFIN%2BGBR%2BIBS%2BGIH%2BPJL%2BBEB%2BSTU%2BITU&genome_build=grch37&tab=ldpair
43. Double Helix [Internet]. [geciteerd 15 mei 2023]. Beschikbaar op: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Double-Helix>
44. DNA sequencing - Labster Theory [Internet]. [geciteerd 15 mei 2023]. Beschikbaar op: https://theory.labster.com/DNA_sequencing/
45. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) | Thermo Fisher Scientific - BE [Internet]. [geciteerd 5 juni 2023]. Beschikbaar op: <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/pcr/isothermal-nucleic-acid-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification.html>
46. Butler JM. DNA Quantitation. In: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier; 2012. p. 49–67.

8. APPENDIX

Bijlage 3.1: Specificaties materiaal Sanger sequencing

Materiaal en reagentia	Leverancier, stad, land	Lotnummer/serienummer
Capillaire sequencer ABI 3730XL (fragment analyzer)	Applied biosystems	20143-015
Labcycler Gradient Thermocycler (PCR-toestel)	SensoQuest GmbH, Göttingen, Duitsland	1122220163
KAPA2G Robust Hotstart Readymix	KAPA biosystems, Wilmington, VS	8203954001
Antarctic phosphatase (5000U/ml)	Bioké, Leiden, Nederland	10140302
Exonuclease I (2000 U/ml)	Bioké, Leiden, Nederland	10156836
BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit	Applied biosystems	01250312
CleanDTR beads	GC Biotech	24883DE6
Ethanol absolute	VWR Chemicals, Pennsylvania, VS	22H164012

Bijlage 3.2: Specificaties materiaal LAMP

Materiaal en reagentia	Leverancier, stad, land	Lotnummer/serienummer
Quantstudio 5	Applied biosystems, Singapore	GTZYR33
LightCycler® 480 II	Roche, Mannheim, Duitsland	6956
LightCycler® 480 384-wellplaat + folie	Roche, Mannheim, Duitsland	22006595 (plaat) 2023-09-LP (folie)
LAMP kit	LaCar, Luik, België	19503C

Bijlage 3.3: Specificaties materiaal Taqman SNP Genotyping Assays

Materiaal en reagentia	Leverancier, stad, land	Lotnummer/serienummer
Quantstudio 5	Applied biosystems, Singapore	GTZYR33
MicroAmp Optical 384-wellplaten + folie	Applied biosystems, Singapore	C3607S29 (plaat) 33JKLY (folie)
Taqman Genotyping Master Mix	Applied biosystems, Vilnius, Litouwen	2572341
Taqman Predesigned SNP Genotyping Assay (300 reacties)	Applied biosystems, Pleasanton, VS	P230426-004 F07
Taqman DME Genotyping Assay (150 reacties)	Applied biosystems, Pleasanton, VS	P230403-006 C03

Bijlage 4.1: Rapportering van staal 18

- Rapport Sanger sequencing in SeqPilot

Center for Medical Genetics

C.Heymanslaan 10

B-9000 Ghent

<https://www.cmgg.be>



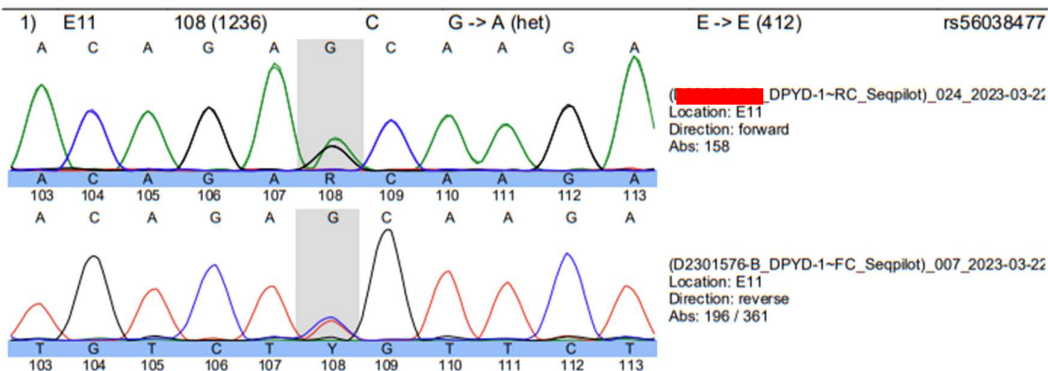
SEQUENCING REPORT

Patient: P- [REDACTED] Pat.-ID: [REDACTED] Family ID:
 Order No: 230810034 (DNA No: [REDACTED]) Sample Src: Project:
 Assigned by: Date of assignment:

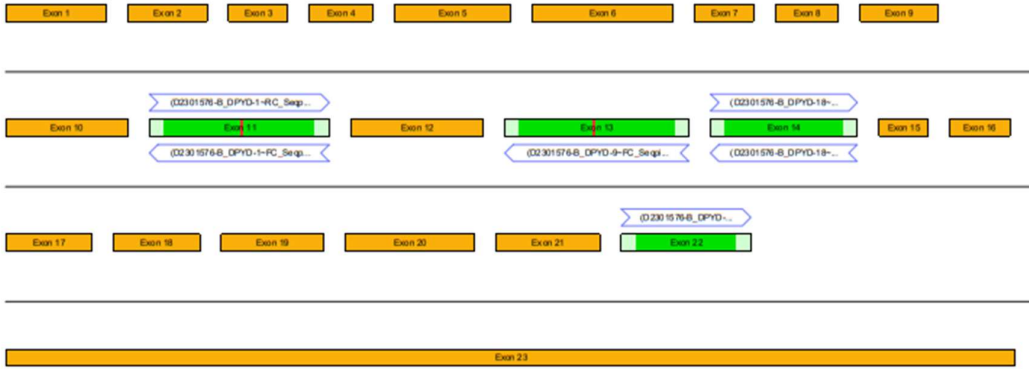
Gene: DPYD MV:
 gene info: ENSG00000188641.13
 transcript info: ENST00000370192.7

Result:

Index	Location	Position	Type	Nuc Change	AA Change	Web Ref	Mut Ref	Mut Effect
1	E11	108 (1236)	C	G -> A (het)	E -> E (412)	rs56038477	c.1236G>A	sc 0.5 HapB3 - decrease functio



	result files	exon positions	abs. positions
E11	([REDACTED] DPYD-1~RC_Seqpilot)_024_2023-03-22_-20..+20		31..281
	([REDACTED] DPYD-1~FC_Seqpilot)_007_2023-03-22_-20..+20		69..319 / 488..238
E13	([REDACTED] DPYD-9~FC_Seqpilot)_003_2023-03-22_-20..+20		124..379 / 356..101
E14	([REDACTED] DPYD-18~RC_Seqpilot)_018_2023-03-22_-20..+20		76..280
	([REDACTED] DPYD-18~FC_Seqpilot)_001_2023-03-22_-20..+20		109..313 / 388..184
E22	([REDACTED] DPYD-6~RC_Seqpilot)_022_2023-03-22_-20..+20		206..386



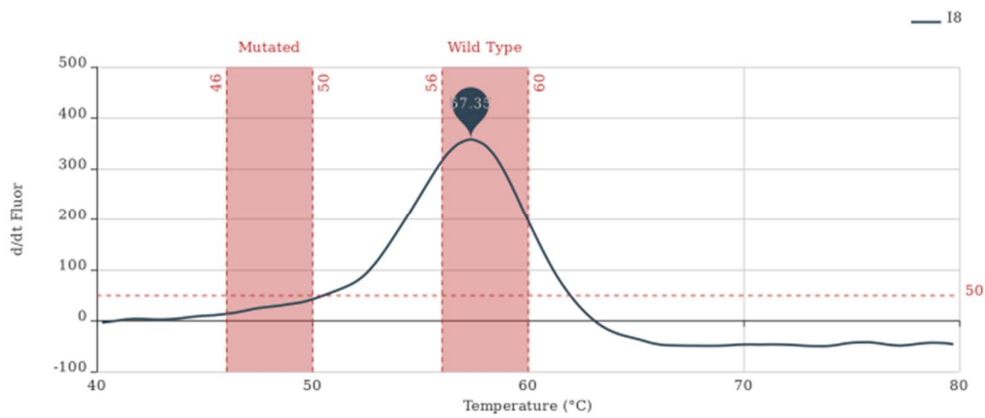
Comment:

- Rapport LAMP analyse in Genefox

Export GeneFOX Run 28

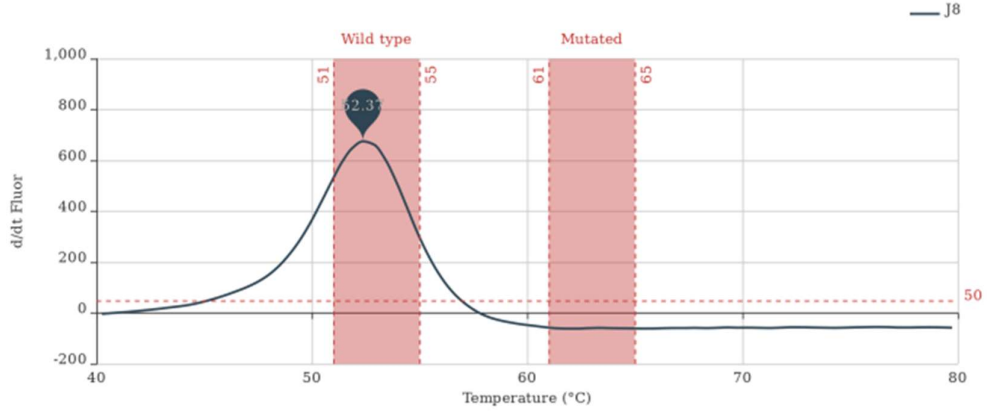
Run Name	20230329_smeltcurve1 LaCar	Instr. Model	LC-480 - II
Run Date	2023-03-29	Instr. Name	LC480 6956
Responsible User	System Admin	PlateId	E0115500
Comment		Interpreted By	suzanne vanhauwaert
Submitted By	suzanne vanhauwaert		

LC-DPD-LP - 2.1 DPYD*2A - Melt graph



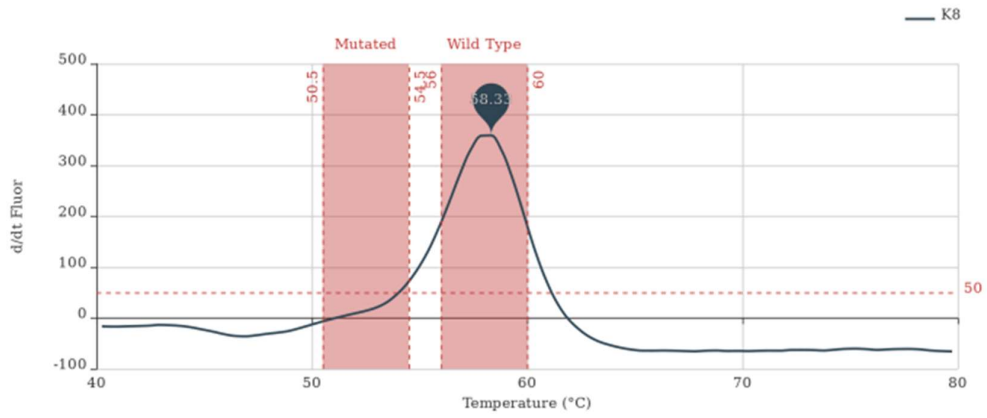
Pos	Well Name	Sample Type	Kit - RB	Lot	Suggested result	Anneal	Melt
18		DNA	DPD - 2.1 DPYD*2A	19503C	Homozygous Wild Type		57.35

LC-DPD-LP - 2.2 DPYD*13 - Melt graph



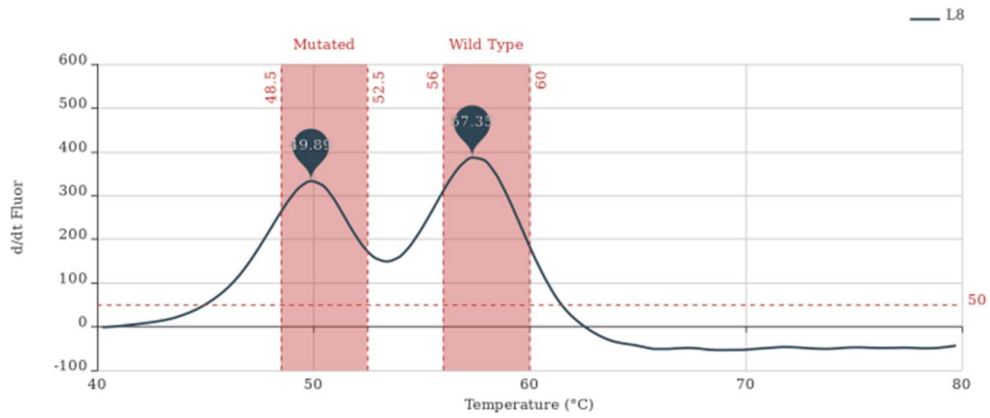
Pos	Well Name	Sample Type	Kit - RB	Lot	Suggested result	Anneal	Melt
J8		DNA	DPD - 2.2 DPYD*13	19503C	Homozygous Wild Type		52.37

LC-DPD-LP - 2.3 DPYD rs67 - Melt graph



Pos	Well Name	Sample Type	Kit - RB	Lot	Suggested result	Anneal	Melt
K8		DNA	DPD - 2.3 DPYD rs67	19503C	Homozygous Wild Type		58.33

LC-DPD-LP - 2.4 DPYD rs56 - Melt graph



Pos	Well Name	Sample Type	Kit - RB	Lot	Suggested result	Anneal	Melt
L8		DNA	DPD - 2.4 DPYD rs56	19503C	Heterozygous		49.89 57.35

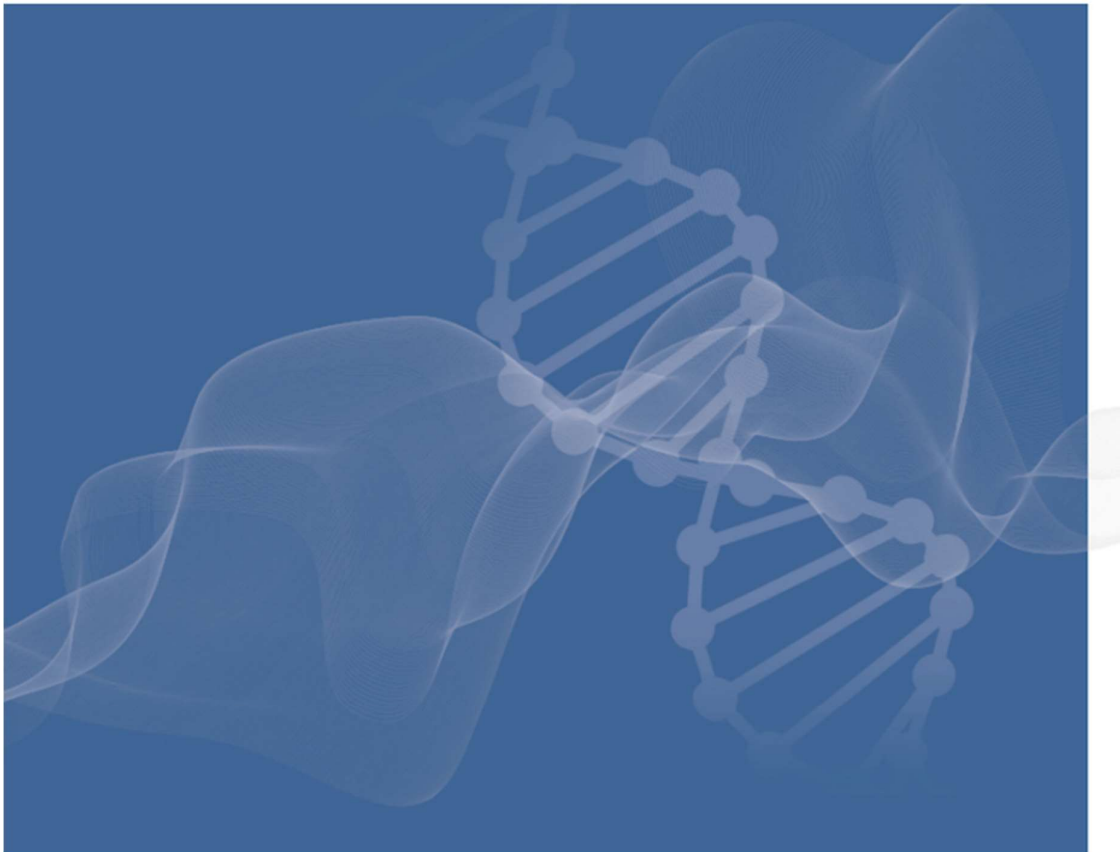
- Rapport LAMP analyse in Quantstudio

appliedbiosystems
by Thermo Fisher Scientific

Design & Analysis Software
Plate Results Report

Plate Results Report

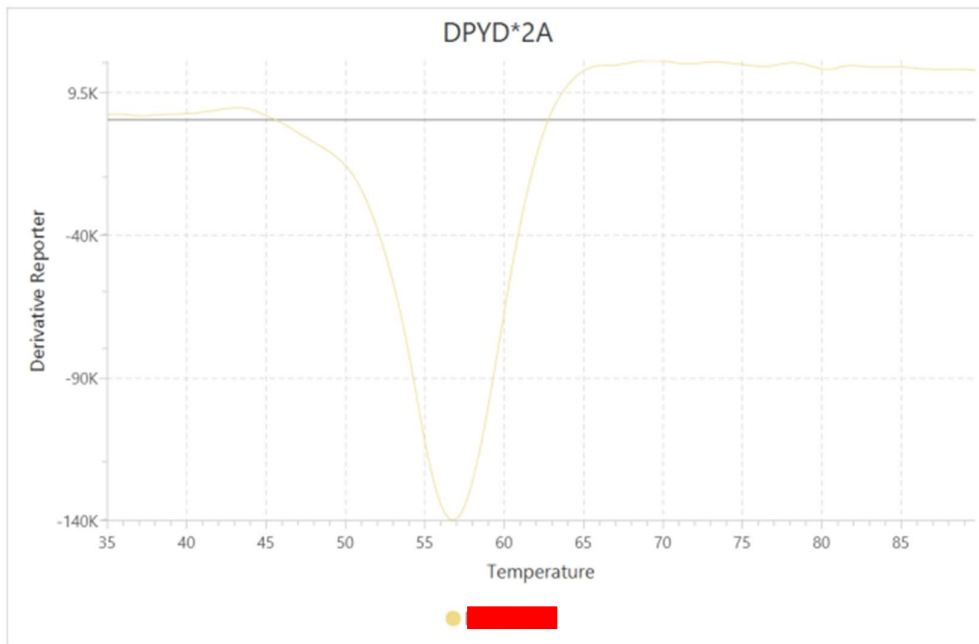
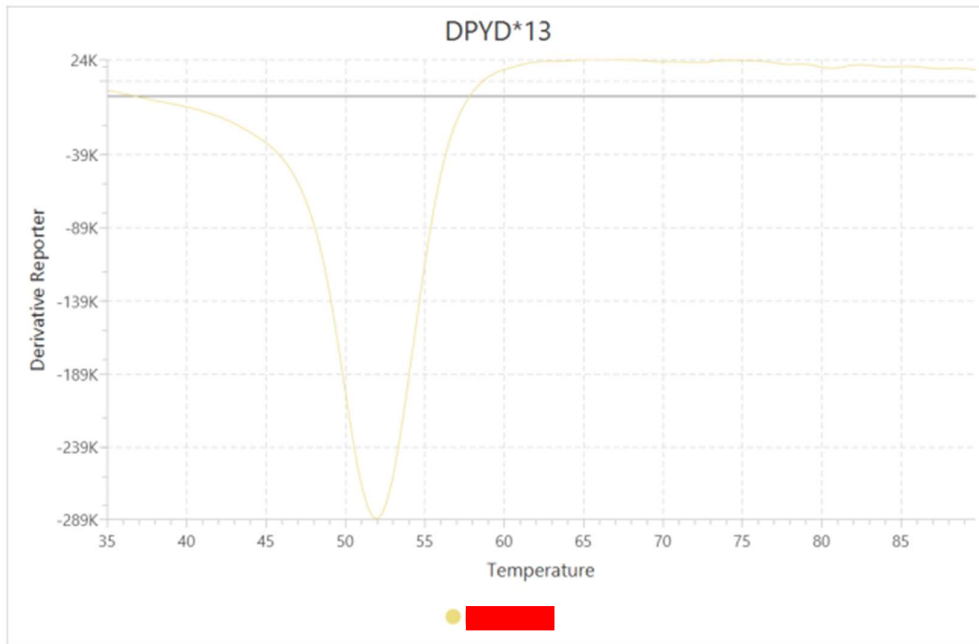
20230503_LAMP_Duplex test dpyd 2.eds

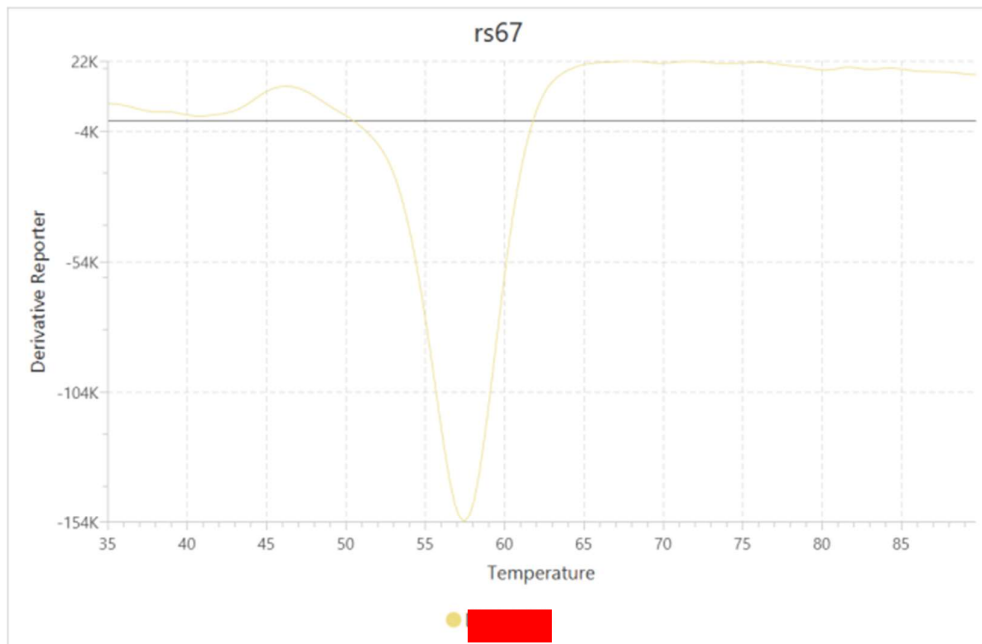
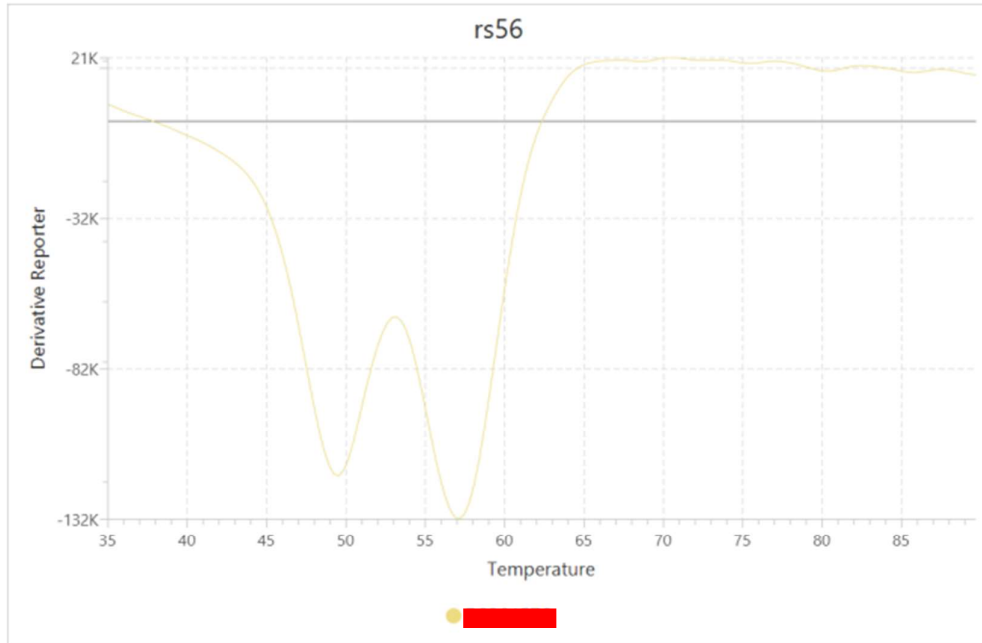


Summary

Property	Details
Bar Code	-
File Name	20230503_LAMP_Duplex test dpyd 2.eds
Run Start Date/Time	May 3, 2023 10:17:26 AM
Run End Date/Time	May 3, 2023 11:11:30 AM
Run Duration	54 minutes, and 3 seconds
Operator	DEFAULT
Instrument Name	Kimberly
Instrument Type	QuantStudio™ 5 System
Instrument Serial Number	272532012
Block Type	384-Well
Block Serial Number	20390834
Heated Cover Serial Number	N/A
PCR Stage/Step Number	Stage 0, Step 0
Melt Stage Number	Stage 2
Quantification Cycle Method	Baseline Threshold
Comment	-
Software Name and Version	Design & Analysis Software v2.6.0
Plugin Name and Version	Primary Analysis v1.7.0, Standard Curve v1.6.0
Analysis Date/Time	May 19, 2023 5:30:55 PM

Melt Curve Plot





Run Method

Block Type 384-Well Block
Sample Volume 10.0
Cover Temperature 105.0
Run mode STANDARD

Stage	Collection Flag	Ramp Rate	Temperature	Hold Time	Starting Cycle	Auto Delta Temperature	Auto Delta Hold Time
PCR Stage (30 cycles)	false	1.6°C/sec	65.0°C	60	-	-	-
Melt Stage	false	1.6°C/sec	90.0°C	2	-	-	-
	false	0.8°C/sec	35.0°C	600	-	-	-
	true	0.1°C/sec	90.0°C	1	-	-	-

- End of Report -

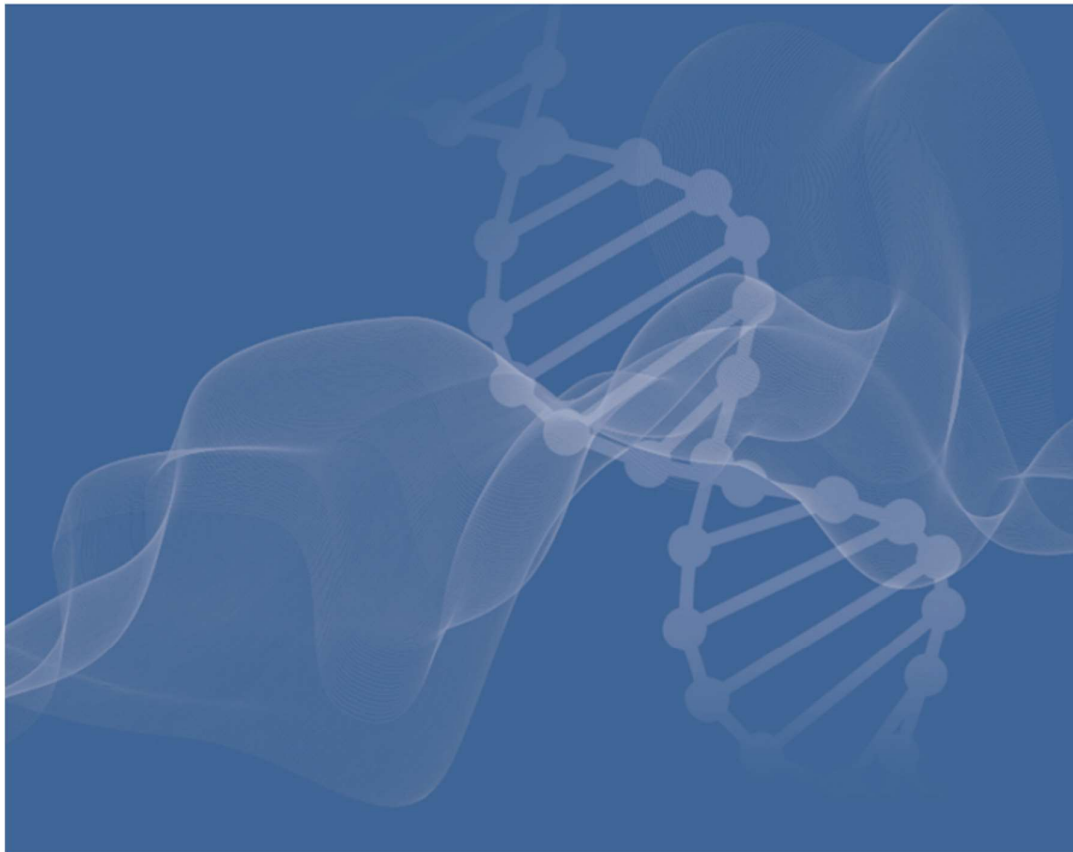
- Rapport Taqman Assay in Quantstudio

appliedbiosystems
by Thermo Fisher Scientific

Design & Analysis Software
Plate Results Report

Plate Results Report

20231005 taqman snp genotyping 1236 g a.eds



Summary

Property	Details
Bar Code	-
File Name	20231005 taqman snp genotyping 1236 g a.eds
Run Start Date/Time	May 10, 2023 4:57:01 PM
Run End Date/Time	May 10, 2023 6:29:49 PM
Run Duration	1 hour, 32 minutes, and 48 seconds
Operator	DEFAULT
Instrument Name	272531935
Instrument Type	QuantStudio™ 5 System
Instrument Serial Number	272531935
Block Type	384-Well
Block Serial Number	20342034
Heated Cover Serial Number	N/A
PCR Stage/Step Number	Stage 3, Step 2
Pre-Read Stage/Step	Stage 1, Step 1
Post-read Stage/Step	Stage 4, Step 1
Quantification Cycle Method	Baseline Threshold
Comment	-
Software Name and Version	Design & Analysis Software v2.6.0
Plugin Name and Version	Primary Analysis v1.7.0, Genotyping v1.4.0
Analysis Date/Time	May 19, 2023 5:57:22 PM

Run Method

Block Type 384-Well Block
Sample Volume 5.0
Cover Temperature 105.0
Run mode STANDARD

Stage	Collection Flag	Ramp Rate	Temperature	Hold Time	Starting Cycle	Auto Delta Temperature	Auto Delta Hold Time
Pre Read Stage	true	1.6°C/sec	60.0°C	30	-	-	-
Hold Stage	false	1.6°C/sec	95.0°C	600	-	-	-
PCR Stage (40 cycles)	false	1.6°C/sec	95.0°C	15	-	-	-
	true	1.6°C/sec	60.0°C	60	-	-	-
Post Read Stage	true	1.6°C/sec	60.0°C	30	-	-	-

Genotyping Settings

Analysis Data

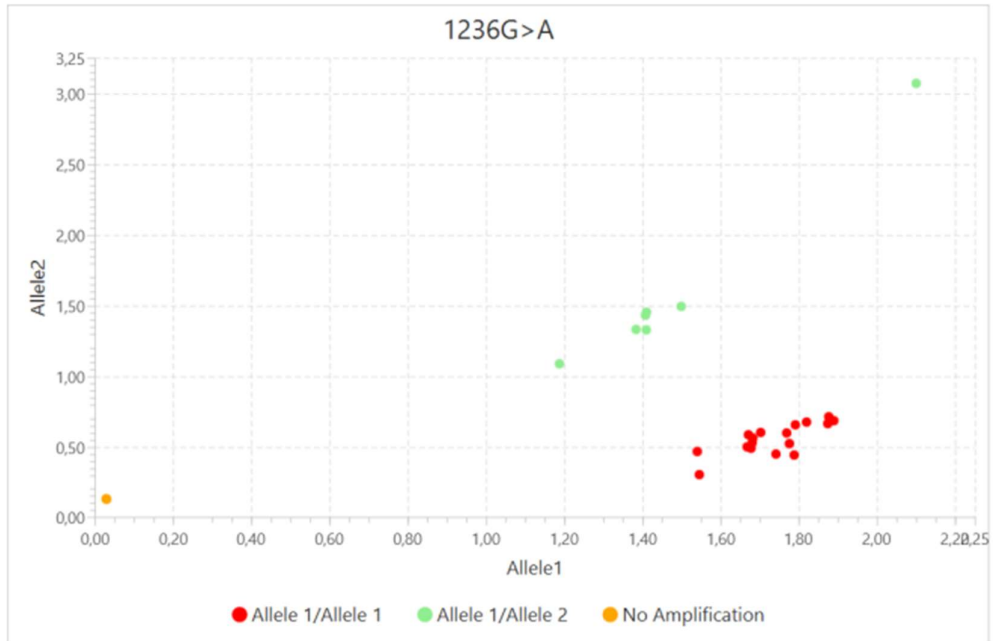
Pre Read and Post Read

Assay	Min Confidence (%)
DEFAULT	95

Genotyping Results

Well	Sample	Sample Type	SNP Assay	Task	Confidence	Allele 1	Allele 2	Call	Manual Call
C2		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.874	0.666	Allele 1/Allele 1	false
C4		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.82	0.677	Allele 1/Allele 1	false
C6		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.89	0.687	Allele 1/Allele 1	false
C8		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.678	0.492	Allele 1/Allele 1	false
C10		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.681	0.532	Allele 1/Allele 1	false
E2		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.742	0.451	Allele 1/Allele 1	false
E4		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.877	0.715	Allele 1/Allele 1	false
E6		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.791	0.657	Allele 1/Allele 1	false
E8		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.703	0.603	Allele 1/Allele 1	false
E10		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.683	0.565	Allele 1/Allele 1	false
G2		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.546	0.306	Allele 1/Allele 1	false
G4		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.668	0.502	Allele 1/Allele 1	false
G6		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.671	0.587	Allele 1/Allele 1	false
G8		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.411	1.454	Allele 1/Allele 2	false
G10		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.541	0.469	Allele 1/Allele 1	false
I2		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.788	0.444	Allele 1/Allele 1	false
I4		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.776	0.525	Allele 1/Allele 1	false
I6		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.384	1.332	Allele 1/Allele 2	false
I8		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.5	1.494	Allele 1/Allele 2	false
I10		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.408	1.432	Allele 1/Allele 2	false
K2		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.188	1.089	Allele 1/Allele 2	false
K4		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.41	1.329	Allele 1/Allele 2	false
K6		Unknown	1236G>A	Unknown	0.98	1.769	0.6	Allele 1/Allele 1	false
K8		Negative Control	1236G>A	Negative Control	1	0.03	0.125	No Amplification	false
K10		Negative Control	1236G>A	Negative Control	1	0.029	0.128	No Amplification	false
K12		Positive 1/2	1236G>A	Positive 1/2	0.978	2.101	3.071	Allele 1/Allele 2	false

Allelic Discrimination Plot



- End of Report -

Bijlage 4.2: Resultaten van alle geanalyseerde stalen ^a

DNA staal	Sanger sequencering	LAMP Human DPD Deficiency Kit (LaCar)	Taqman SNP Genotyping Assays (Thermofisher)
Leuven-1	1905C>G	Abnormaal voor 1905+1G>A	
Leuven-2	1905C>T	Abnormaal voor 1905+1G>A	
Leuven-3	1229G>A	Abnormaal voor 1236G>A	
Leuven-4	1218G>A	WT	
Leuven-5	2843T>C	2846A>T (het)	
1	1905+1G>A 2846A>T 2194G>A 1627A>G	1905+1G>A (het) 2846A>T (het)	
2	1236G>A	1236G>A (het)	1236G>A (het)
3	1905+1G>A	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)
4	1679T>G	1679T>G (hom)	
5	2846A>T	2846A>T (het)	
6	1905+17A>G	WT	
7	1280T>C 85T>C 1129-15T>C 1896T>C 496A>G 1627A>G	WT	
8	WT	WT	
9	1627A>G	WT	
10	1601G>A	WT	
11	WT	WT	
12	WT	WT	

13	2846A>T	2846A>T (het)	
14	1905+1G>A	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)
15	2846A>T (het) 1129-15T>C	2846A>T (het)	
16	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)
17	1679T>G (het)	1679T>G (het)	
18	1236G>A (het) 1627A>G	1236G>A (het)	1236G>A (het)
19	1905+1G>A 1896T>C 496A>G 1627A>G 1129-15T>C	1905+1G>A (het)	1905+1G>A (het)
20	1627A>G	WT	
21	1236G>A 1129-5923C>G 483+18G>A 85T>C	1236G>A (het)	1236G>A (het)
22	1236G>A	1236G>A (het)	1236G>A (het)
23	1236G>A	1236G>A (het)	1236G>A (het)
24	1236G>A	1236G>A (het)	1236G>A (het)
25	258G>A	WT	
26	1896T>C 1601G>A	WT	
27	1679T>G	1679T>G (het)	
28	2846A>T	2846A>T (het)	
29	2846A>T	2846A>T (het)	

^a heterozygoot (het), homozygoot (hom)

Masterproef voorgelegd aan de faculteit Farmaceutische Wetenschappen, uitgevoerd i.s.m. het Laboratorium voor Medische Genetica te Gent.

Promotor: Prof. dr. Kathleen Claes

Commissarissen: Prof. Lies Lahousse en Prof. Pieter De Cock

Deze masterproef is een examendocument dat niet noodzakelijk werd gecorrigeerd voor eventuele fouten. De informatie, conclusies en standpunten opgenomen in deze masterthesis zijn op rekening van de auteur en vertegenwoordigen niet noodzakelijk de mening van de promotor of zijn/haar onderzoeksgroep.