

# DIHYDROPYRIMIDIN DEHYDROGENÁZA A JEJÍ ROLE V PREDIKTIVNÍ ONKOLOGII

## DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE AND ITS ROLE IN PREDICTIVE ONCOLOGY

KLOCOVÁ K., SVOBODA M., VYZULA R.

LABORATOŘ PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** Fluoropyrimidinová chemoterapeutika v čele s 5-fluorouracilem se využívají v léčbě nádorových onemocnění už od poloviny minulého století. I když je 5-fluorouracil (5-FU) hlavním lékem využívaným v terapii kolorektálního karcinomu, pacientů rezpozivních na tuto léčbu je jen 15 – 30 % a u některých se může objevit závažná toxicita. Pochopení metabolismu 5-FU vedlo k odhalení enzymů limitujících biochemickou odpověď 5-FU. Tyto prediktory rezistence by mohly být sledovány před nasazením terapie s cílem určit pravděpodobnost pozitivní reakce na léčbu a umožnit použití jiného chemoterapeutika v případě nízké pravděpodobnosti léčebné odpovědi. Jedním z těchto prediktorů je enzym dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), který se podílí na katabolismu 5-fluorouracilu na neaktivní metabolity. Je přítomen v zdravých i nádorových buňkách, její exprese je však v normálních buňkách vyšší. Vysoká aktivita DPD v nádorových buňkách způsobí inaktivaci 5-FU dříve, než by se mohl projevit cytotoxický efekt chemoterapeutika. Naproti tomu deficience DPD v organismu může vést k vzniku nebezpečné toxicity.

**Klíčová slova:** 5-fluorouracil, dihydropyrimidin dehydrogenáza, chemorezistence k fluoropyrimidinům

**Summary:** Fluoropyrimidine chemotherapeutics headed by 5-fluorouracil are used for the treatment of cancer since half of the last century. Though 5-fluorouracil (5-FU) is mainly used drug in the therapy of colorectal cancer, only 15 – 30 % of patients are responsive to this treatment and some of them could suffer from severe toxicity. The understanding of 5-FU metabolism led to detection of enzymes limiting 5-FU bioefficiency. These resistance predictors could be followed-up before beginning of the cure to determine positive cure reaction probability or to enable to dispose another chemotherapy if the probability of cure response is weak. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) which participates in 5-FU catabolism is one of these predictors. DPD is present in normal and cancer cells, its expression is higher in normal cells. High DPD activity in tumour cells causes 5-FU inactivation before the cytotoxic effect of chemotherapeutics could exert. On the other side, DPD deficiency could result in development of life-threatening toxicity.

**Key words:** 5-fluorouracil, dihydropyrimidine dehydrogenase, chemoresistance to fluoropyrimidines

### Metabolismus a mechanismy působení fluoropyrimidinů

Fluorouracil je nejpoužívanějším představitelem fluoropyrimidinových chemoterapeutik. Byl syntetizován Heidelbergerem před více než 40 lety. Používá se jako chemoterapeutikum u různých forem solidních nádorů, především kolorektálních karcinomů, nádorů žaludku, jater a pankreatu. Nevýhodou je jeho toxicita, široká inter i intraindividuální variabilita a ovlivnění léčebné odpovědi cirkadiálním rytmem. Nejvyšší koncentrace 5-FU v plazmě byly naměřeny ve 4 hodiny ráno, nejnižší pak ve 13 hodin odpoledne. (1, 2)

Metabolismus 5-FU normálně probíhá v játrech (80%). Přes 10 % 5-FU je vyloučeno močí v nezměněné podobě. 5-FU je do buněk přijímán stejnou transportní cestou jako uracil. Tento systém je energeticky nezávislý. Anabolickou cestou vznikají aktivní metabolity, katabolickou cestou je 5-FU inaktivován a vyloučen z organismu. Pro uplatnění cytotoxického a protinádorového účinku je nezbytná jeho intracelulární anabolická aktivace. Poločas rozpadu 5-FU je velmi rychlý, asi 5 až 20 minut. Citlivost buněk k 5-FU závisí na mnoha faktorech, jako je například aktivita enzymů zahrnutých do metabolismu fluoropyrimidinů, dostupnost kofaktorů pro tyto enzymy, množství redukováných folátů v buňce, které stabilizují ternární komplex s tymidylát syntázou, a endogenních deoxyuridinmonofosfátů (dUMP). (3, 4)

Vzniklé aktivní metabolity 5-FU (FUTP, FdUMP a FdUTP) způsobují poškození buňky. FUTP je inkorporován do jaderné a cytoplazmatické RNA, tím se změní její funkce a sníží se

životaschopnost buňky. FdUMP inhibuje enzym tymidylát syntázu (TS), která je nezbytná pro tvorbu jednoho z deoxyribonukleotidů pro syntézu DNA, tvorbou stabilního komplexu. FdUTP může být začleňován enzymem DNA polymerázou do DNA, tím se sníží její stabilita a vznikají fragmenty DNA. (1, 3 – 5)

Protinádorový účinek 5-FU tedy spočívá ve dvou hlavních účincích:

- a) v tvorbě 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5-monofosfátu (FdUMP), který se váže na enzym tymidylát syntázu a brání tak tvorbě nukleotidu tymidin monofosfátu (TMP) a inhibuje syntézu DNA.
- b) 5-FU je také přeměňován na 5-fluorouridin-5'-trifosfát (FUTP), který se začleňuje do RNA a tím ovlivňuje její funkce v zasažené buňce.

Na úrovni buněčného cyklu působí 5-FU na buněčné linie v různých fázích, podle typu linie a aplikované dávky. U pacientů s kolorektálním karcinomem byla po chemoterapii pozorována zástava buněk v S a G2/M fázi. (6)

### DPD a její vliv na rezistenci k fluoropyrimidinům

Prvním katabolickým krokem je redukce pyrimidinového kruhu 5-FU enzymem *dihydropyrimidin dehydrogenázou* (DPD). Deficience tohoto enzymu u pacientů léčených fluoropyrimidiny je spojena s vážnou toxicitou (5). Výsledným produktem katabolismu 5-FU je fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL). Tento metabolit je vylučován močí, má dlouhý poločas rozpadu a může působit neurotoxicky. (1, 3 – 5)

Aktivita 5-FU je limitována jeho rychlou degradací dihydropyrimidin dehydrogenázou. Více než 80 % 5-FU je degradováno v játrech. Jen malá část přijaté dávky 5-FU se dostane do nádoru, kde se mohou uplatnit protinádorové účinky látky. Vysoká hladina nádorové DPD umožní katalyzovat přeměnu 5-FU na neaktivní produkty dříve, než mohou být vytvořeny cytotoxické nukleotidy a neprojeví se tak protinádorový efekt léčiva. Deficience DPD vede k vyššímu riziku vážné toxicity zásluhou vysoké expozice organismu 5-FU. U pacientů s kolo- rektálním nádorem reagujících na léčbu 5-fluorouracilem byla nalezena nižší exprese DPD ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu neodpovídali. (3, 7) Na druhé straně, v některých studiích souvislost aktivity DPD s reakcí na 5-FU a přežíváním pacientů nebyla pozorována. (9 - 11)

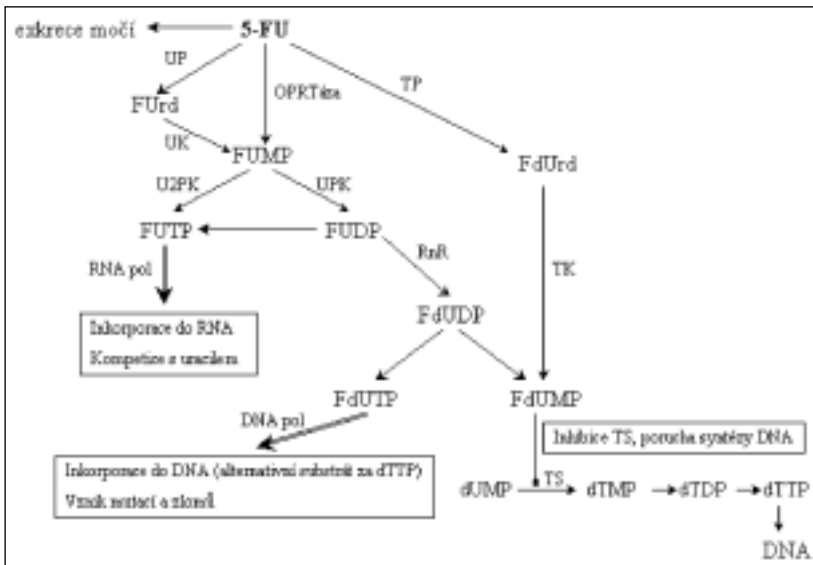
Byla pozorována závislost mezi hladinou DPD mRNA a aktivitou DPD enzymu u kolorektálních nádorů. (7, 12 - 15) Je-li v tkáni vysoká hladina mRNA a vysoká aktivita DPD enzymu, je 5-FU rychle katabolizován na 2-fluoro- $\alpha$ -alanin a je potlačena anabolická konverze 5-FU fosforylací na FUMP a FUTP. Hladina mRNA a enzymatická aktivita DPD by mohly předpovědět senzitivitu pacienta k léčbě 5-FU. Vysoká hla-

dina DPD může snížit citlivost buněk k 5-FU a způsobit rezistenci.

Variabilita v toxicitě a reakci na lék může být částečně způsobena genetickou deficiencí enzymu DPD. U malého procenta populace (méně než 3%) je aktivita DPD významně snížená (až o 50% proti průměrné kontrole). Tato porucha (tzn. neschopnost degradovat 5-FU) může mít za následek předem neočekávatelné a velice závažné toxické účinky u pacientů podstupujících 5-FU chemoterapii. Nejčastější mutací vedoucí k deficienci DPD je záměna nukleotidu G za A v intronu 14, která způsobuje špatný sestřih mRNA a vznik nefunkčního enzymu. Pacienti, pro něž je 5-FU vysoce toxický, mohou být zřejmě heterozygotní nebo homozygotní pro mutantní gen DPD. (9, 16 - 19)

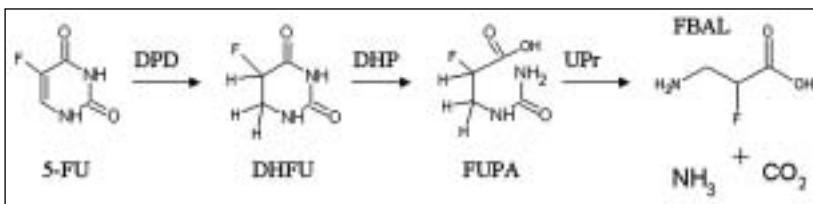
DPD aktivita může být ovlivněna různými faktory: obsah enzymu, přítomnost DPD inhibitorů (cisplatina, uridin, allopurinol), hladina NADPH kofaktorů. (2, 20) Některé studie poukazují na souvislost mezi hladinou nádorové DPD a pohlavím, u žen byla nalezena nižší hladina. (16, 21, 22). Hladina DPD je také zřejmě ovlivněna cirkadiálním rytmem. (2, 22, 23) Jiné studie tuto skutečnost nepotvrdily. (24)

Obr. 1: Anabolismus 5-fluorouracilu



Počáteční anabolická aktivace 5-fluorouracilu (5-FU) může probíhat dvěma cestami. Buď přímým přenosem ribóza fosfátu z fosforibozyl pyrofosfátu, katalyzovaným enzymem OPRTázou (fosforibozyltransferáza kyseliny orotové) za vzniku fluorouridinmonofosfátu (FUMP), nebo dvojkrokovým procesem, zahrnujícím navázání ribózy enzymem uridin fosforylázou (UP) za vzniku fluorouridinu (FUrđ) a jeho následnou fosforylací uridin kinázou (UK). Produkty těchto reakcí jsou dále fosforylovány uridin monofosfát kinázou (UPK) a uridin difosfát kinázou (U2PK) na fluorouridin difosfát (FUDP) a fluorouridin trifosfát (FUTP), který je inkorporován RNA polymerázou do RNA. FUDP může být konvertován ribonukleotid reduktázou (RnR) na fluorodeoxyuridin difosfát (FdUDP), který je poté metabolizován na fluorodeoxyuridin monofosfát (FdUMP) nebo fluorodeoxyuridin trifosfát (FdUTP) začleňovaný DNA polymerázou do DNA. Účinkem enzymu tymidin fosforyláza (TP) na 5-FU vzniká fluorodeoxyuridin (FdUrd), který je tymidin kinázou přeměněn na FdUMP.

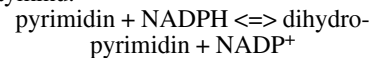
Obr. 2: Katabolické odbourávání 5-FU



Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) inaktivuje 5-fluorouracil (5-FU) redukcí pyrimidinového kruhu na 5',6'-dihydrofluorouracil (DHFU), který může být přeměněn dihydropyrimidinázou (DHP) na 5-fluoroureido propionovou kyselinu (FUPA). Ta je za katalýzy  $\beta$ -ureido propionázy (UPr) a za uvolnění  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$  konvertována na fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL).

### Struktura a funkce dihydropyrimidin dehydrogenázy

Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD, EC 1.3.1.2) je počátečním a limitujícím enzymem v katabolismu pyrimidinových bází, redukuje dvojnou vazbu uracilu i tyminu:



a podílí se na vzniku  $\beta$ -alaninu u savců. V buňce je přítomna v cytoplazmě. Nativní savčí enzym má molekulární hmotnost 210 kDa a je tvořen dvěma identickými podjednotkami. (28)

Lidský DPD gen byl lokalizován na první chromozóm (1p22) a je dlouhý nejméně 950 kb. Je tvořen 23 exony, z nichž nejdelší je exon 23 (961 bp) a nejkratší je exon 15 (69 bp). Transkripce vzniká mRNA o velikosti 3,4 kb. Lidská cDNA kóduje protein skládající se z 1025 aminokyselin s předpokládanou molekulární hmotností 111 kDa. (25 - 26)

Expres DPD mRNA je tkáňově specifická, DPD enzym je u zdravých jedinců přítomen hlavně v játrech. (30 - 32) Aktivita v normální tkáni je variabilní. Vyšší aktivita DPD enzymu byla mimo jaterní tkáň detekována také v pankreatu, cervixu a nádorech prsu. Nižší hladina DPD je v buňkách žaludku, prostaty, močového měchýře a močovodů. (11, 30) V primárním kolorektálním nádoru i metastázách je nižší stupeň exprese DPD než ve zdravé mukóze. (7, 11, 13, 33, 34) V nádorech močového měchýře a močových cest byla pozorována vyšší hladina DPD ve srovnání s příslušnou zdravou tkání. (35 - 37)

### Inhibitory dihydropyrimidin dehydrogenázy, jejich výhody a nevýhody

Potlačení účinku DPD je spojeno s prodloužením přítomnosti 5-FU v plazmě. Látky, které slouží jako inhibitory DPD aktivity, zvyšují účinek 5-FU v případě, je-li hladina DPD příliš vysoká. 5-FU není tak rychle přeměňován na neaktivní metabolity a u pacienta se může snížit stupeň

rezistence. Dramatická redukce 5-FU katabolismu ovšem musí být doprovázena také snížením dávek 5-FU, aby bylo zamezeno případným závažným toxickým účinkům. (38)

Tyto inhibitory lze rozdělit do dvou skupin podle jejich účinku: ireverzibilní inaktivátory (eniluracil) a reverzibilní inhibitory (uracil, CDHP, CNDP).

Do první skupiny patří eniluracil (5-ethynyluracil). Kovalentně se váže na DPD a nevratně tak inhibuje katalytickou aktivitu tohoto enzymu. Jeho podání snižuje inter a intraindividuální variabilitu a vliv cirkadiálního rytmu. Perorálně podávaný eniluracil inaktivuje DPD v gastrointestinálním traktu a játrech, čímž zesílí dostupnost (až na 100%) a poločas života 5-FU (až na 4–6 hodin). Eniluracil v kombinaci s 5-FU byl testován na zvířatech a bylo pozorováno výrazné zvýšení 5-FU účinnosti. Mezi nežádoucí účinky patří nevolnost a průjmy. (1, 5, 39, 40)

Reverzibilně působí uracil, který v nádorové tkáni selektivně inhibuje degradaci 5-fluorouracilu tím, že kompetitivně inhibuje DPD. Malé množství 5-FU je tedy degradováno katabolickou cestou. Uracil v kombinaci s tegafurem v poměru 4:1 představuje další léčivo UFT (uracil/tegafur). Tegafur slouží jako „prodrug“ 5-FU, je konvertován enzymy v játrech na 5-FU a navozuje vysokou hladinu 5-FU v plazmě. Podávání UFT tedy zajistí vysokou zásobu 5-FU a jeho aktivních metabolitů a minimalizuje produkci inaktivních potenciálně toxických katabolitů 5-FU. UFT byl v klinických studiích většinou dobře tolerován a byl účinný u pacientů s nádory tlustého střeva, žaludku a prsu. Výhodou je i orální aplikace léku. Mezi nežádoucí účinky opět patří nevolnost a průjmy. (1, 4, 5, 39)

Dalším účinným reverzibilním inhibitorem DPD je CDHP (5-chloro-2,4-dihydropyridin), působí mnohem silněji než uracil. Je součástí chemoterapeutika S-1 vyvinutého v Japonsku v roce 1996. S-1 je kombinací tegafuru, 5-chloro-2,4-dihydropyridinu a oxonové kyseliny s pevným molárním poměrem 1 : 0,4 : 1. CDHP redukuje degradaci 5-FU a prodlužuje vysokou koncentraci 5-FU v plazmě, oxonová kyselina působí proti přeměně 5-FU na FUMP, sami o sobě nemají protinádorový účinek. V preklinických zkouškách měl S-1 vyšší protinádorový účinek a menší toxicitu než tegafur podávaný samostatně. Dávkou limitovanou toxicitou byla v klinických zkouškách myelosuprese; diarhoea a stomatitida byly velice mírné. Gastrointestinální toxicitu S-1 snižovala kyselina oxonová. Účinky léku byly podobné účinkům konvenčních terapií, snížila se ovšem toxicita stupně tři a čtyři. (1, 4, 5, 39, 41)

CNDP (3-cyano-2,6-dihydropyridin) funguje jako reverzibilní inhibitor DPD v játrech až 200 krát účinněji než uracil. Společně s 1-ethoxymetyl-5-fluorouracilem (EM-FU) v poměru 1:1 tvoří látku označovanou jako BOF-A2 (emitefur). EM-FU je pomalu konvertován mikrozomálními enzymy, CNDP snižuje eliminaci 5-FU v játrech. Experimentálně bylo zjištěno, že u zvířat po podání BOF-A2 se v periferní krvi udržela vysoká hladina 5-FU po dlouhou dobu a BOF-A2 měl protinádorový účinek. (5, 42)

### Metody stanovení dihydropyrimidin dehydrogenázy

Dihydropyrimidin dehydrogenázu je možno detekovat různými technikami na úrovni RNA nebo proteinu. Jednotlivé metody se liší citlivostí, cenou a náročností provedení. Následující přehled pojednává o nejčastěji využívaných metodách při detekci DPD.

#### Analýza nukleových kyselin

Po izolaci celkové mRNA z testované vzorku je provedena reverzní transkripce a amplifikace cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Pro tuto metodu je postačující menší množství materiálu, další výhodou je vysoká citlivost a snadná příprava vzorku. Vzniklé produkty PCR reakce je nutné nějakým způsobem detekovat. Je možné využít elektroforetickou separaci v agarózovém gelu nebo chromatografii. (13, 34)

Vysokou účinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Per-

formance Liquid Chromatography) je modifikací chromatografie – techniky sloužící k separaci molekul mobilní a stacionární fáze. Její výhodou oproti jednodušší a levnější elektroforeze je vyšší citlivost metody. Analyzovaná látka je rozpuštěná v rozpouštědle, tato kapalná mobilní fáze je nanesena na chromatografickou kolonu, kde dochází k interakcím mezi pevnou složkou a mobilní fází. Různé složky analyzované směsi mají různou afinitu ke stacionární fázi, jsou rozdílně zadržovány a zpožďovány. Přístroj detekuje jednotlivé procházející složky analyzované směsi, které dospějí k detektoru v různých retenčních časech. (13, 16, 34)

Klasická PCR metoda slouží k specifické amplifikaci fragmentu DNA. Po několikanásobném opakování cyklu denaturace dvouřetězce DNA na jednořetězce – hybridizace primerů – polymerace, se mnohonásobně zvýší počet kopií amplifikovaného úseku DNA.

Metoda real-time PCR umožňuje sledování vznikajícího PCR produktu přímo v průběhu celého amplifikačního procesu a následné stanovení koncentrace neznámého vzorku. Pro kvantifikaci se mohou využívat interkalační barviva, např. Sybr Green I, specifickou detekci umožňují sondy, což jsou uměle nasynthetizované oligonukleotidy, o velikosti 20–30 nukleotidů, komplementární k amplifikované oblasti, které se váží mezi primery specifické pro danou oblast. Fluorescenční záření vznikající během reakce je zaznamenáno přístrojovým analyzátozem a s každou vytvořenou molekulou amplikonu narůstá jeho intenzita. Jako referenční geny se využívají *housekeeping* geny, nejčastěji gen pro GAPDH nebo  $\beta$ -aktin, které slouží jako endogenní kontrola se známým počtem kopií. Tato metoda umožňuje stanovení koncentrace v rozsahu několika řádů, je přesnější a citlivější než klasická PCR, probíhá v uzavřeném systému, redukuje chyby a podmínky PCR lze poměrně rychle optimalizovat. (12, 43, 44)

Nevýhodou metod založených na studiu nukleových kyselin je fakt, že není detekována přímo aktivita proteinu v dané tkáni.

#### Stanovení DPD na úrovni proteinu

Imunochemické metody detekce DPD jsou založeny na specifické reakci antigenu a protilátky. Nejčastěji se využívají metody ELISA a Western blotting.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je metoda sloužící k zjišťování přítomnosti protilátek proti určitému antigenu. Umožňuje stanovení DPD enzymu za využití protilátek proti DPD. V případě stanovení DPD lze využít tzv. sendvičovou modifikaci. Vzorek, obsahující zjišťovaný antigen, se aplikuje na destičku, na kterou je vázána protilátka proti DPD. Druhá protilátka je značená enzymem a reaguje s jinými determinanty na povrchu molekuly zjišťovaného antigenu (v tomto případě enzymu DPD). Po přidání chromogenního substrátu je možné detekovat fotometricky barevnou změnu substrátu. Jde o jednoduchou, rychlou a finančně nenáročnou techniku s vysokou citlivostí a specifitou. Nevýhodou je to, že není stanovena přímá aktivita proteinu v tkáni. (3, 5, 10, 11, 33, 34, 45)

Metoda Western blotting využívá polyklonální protilátky a sekundární protilátky. Detekované proteiny jsou elektroforeticky rozděleny za denaturačních podmínek, přeneseny z gelu na pevnou membránu a místa, na která se proteiny nenařadily, se nespecificky zablokují, čímž se zabrání vzniku falešně pozitivních výsledků. K detekci antigenu zachyceného na membráně se využije primární protilátka, která se specificky váže na detekovaný protein. Komplex protilátek a antigenů je vizualizován pomocí enzymu a chromogenního substrátu podobně jako u metody ELISA, na membráně vzniká viditelný band v místě, kde je primární protilátka navázána na detekovaný protein. (7, 13)

### Význam stanovování DPD v predikci chemorezistence nádorů

Sledování enzymů zapojených do metabolismu 5-fluorouracilu (DPD, tymidylát syntáza, tymidin fosforyláza), ať už jed-

notlivě nebo společně, umožňuje optimalizaci terapie fluoropyrimidiny, výběr vhodného preparátu a jeho dávkování. Detekce exprese a aktivity těchto enzymů před zahájením terapie může odhalit pacienty, kteří s velkou pravděpodobností na léčbu fluoropyrimidiny nebudou reagovat, nebo se u nich dokonce objeví vážná toxicita. V těchto případech by pak pacient nemusel být vystavován známému riziku toxicity a mohla by pro něj být navržena jiná forma terapie. Dihydropyrimidin dehydrogenáza je enzym, který katabolicky degraduje více než 80 % přijatého 5-fluorouracilu a limituje jeho účinnost. Sledování hladiny mRNA a enzymatické aktivity DPD dovolí ještě před léčbou předpovědět reakci pacienta na

lék. Je-li u pacienta detekována vysoká hladina DPD v nádorové tkáni, neprojeví se dostatečně protinádorová aktivita 5-FU a pacient bude na léčbu fluorouracilem rezistentní. V tomto případě by nasazení inhibitorů DPD zpomalilo odbourávání a zvýšilo terapeutický účinek 5-FU. Pacientovi mohou být také podávány nižší dávky léku. Naopak, příliš nízká hladina nebo deficiencie DPD zvyšuje riziko toxických účinků terapie způsobených vystavením organismu nadměrným dávkám 5-FU. Stanovení dihydropyrimidin dehydrogenázy a dalších enzymů podílejících se na metabolismu chemoterapeutik povede k větší individualizaci léčby, nižší toxicitě a větší účinnosti léčby nádorových onemocnění.

## Literatura:

- Kuhn JD: Fluorouracil and the new fluorinated pyrimidines. *The Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35: 217–226.
- Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ.: Inter- and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 117–125.
- Gorlick R, Bertino JR: Drug resistance in colon cancer. *Seminars in oncology* 1999; 26 (6): 606–611.
- Malet-Martino M, Martino R: Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A review. *The Oncologist* 2002; 7: 288–323.
- Lamont EB, Schilsky RL: The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2289–2296.
- Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama J, Yamamura T, et al: Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: A novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Research* 2001; 61: 1029–1037.
- Collie-Duguid ESR, Johnston SJ, Boyce L, Smith N, Cowieson A, Cassidy J, et al: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2001; 94, 297–301.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidilate synthase and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6, 1322–1327.
- Fernandez-Salguero P, Gonzales FJ, Etienne MC, Milano G, Kimura S.: Correlation between catalytic activity and protein content for the polymorphically expressed dihydropyrimidine dehydrogenase in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (7), 1015–1020.
- Hiroyasu S, Shiraiishi M, Samura H, Tokashiki H, Shimoji H, Isa T, Muto Y: Clinical relevance of the concentrations of both pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(2): 65–68.
- Ikeguchi M, Hirooka Y, Makino M, Kabara N: Dihydropyrimidine dehydrogenase activity of cancerous and non-cancerous tissues in liver and large intestine. *Oncol Rep* 2001; 8(3): 621–625.
- Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB.: Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2000; 278, 175–184.
- Johnston SJ, Ridge SA, Cassidy J, McLeod HL.: Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5, 2566–2570.
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: Possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91, 105–112.
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5, 883–889.
- Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, René N.: Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil related toxicity. *Br J Cancer* 1999; 79 (3/4), 627–630.
- Raida M, Schwabe W, Häusler P, Van Kuilenburg ABP, Van Gennip AM, Behnke D, et al: Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7, 2832–2839.
- Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P: Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 3: 610–615.
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NG, Meisma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al: Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 1999; 104: 1–9.
- Takechi T, Okabe T, Fujioka A, Mukarami Y, Fukushima M.: Relationship between protein levels and gene expression of dihydropyrimidine dehydrogenase in human tumor cells during growth in culture and in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89, 1144–1153.
- Yamashita K, Mikami Y, Ikeda M, Yamamura M, Kubozoe T, Urakami A, et al: Gender differences in the dihydropyrimidine dehydrogenase expression of colorectal cancers. *Cancer Letters* 2002; 188: 231–236.
- Bressolle F, Julia JM, Pinguet F, Uchou M, Astre C, Duffour J, et al: Circadian rhythm of 5-fluorouracil population pharmacokinetics in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 295–302.
- Porsin B, Formento JL, Filipiński E, Etienne MC, Francouze M, René N, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *European Journal of Cancer* 2003, 39: 822–828.
- McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, et al: Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *British Journal of Cancer* 1998; 77(3): 461–465.
- Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, Lin K, McBride OW, Podschun B, et al: cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 1994; 269 (37), 23192–23196.
- Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB: Structural organisation of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Research* 1997; 57: 1660–1663.
- Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Faunko H, Fernandez-Salguero P, et al: Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 1998; 51: 391–400.
- Lu ZH, Zhang R, Diasio R.: Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem* 1992; 267 (24), 102–117.
- Dobritzsch D, Schneider G, Schnackerz KD, Lingvist Y: Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *The EMBO Journal* 2001; 20(4): 650–660.
- Mori K, Hasegawa M, Nishida M, Toma H, Fukuda M, Kubota T, et al: Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tissues. *Int J Oncol* 2000; 17(1): 33–38.
- Stéphan T, Etienne MC, Wallays C, Milano G, Clergue F.: Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities. *The Am J Med* 1995; 99, 685–688.
- Chazal M, Etienne MC, René N, Bourgeon A, Richelme H, Milano G.: Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 1996; 2, 507–510.
- Ikeguchi M, Makino M, Kabara N: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in colorectal carcinoma and patients prognosis. *Lagenbeck's Arch Surg* 2002; 387: 240–245.
- Tanaka-Nozaki M, Onda M, Tanaka N, Kato S: Variations in 5-fluorouracil concentrations of colorectal tissues as compared with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme activities and DPD messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2783–2787.
- Hirano Y, Kageyama S, Ushiyama T, Suzuki K, Fujita K: Clinical significance of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in transitional cell cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51(1): 29–35.
- Iizumi T, Hariu K, Sato M, Sato S, Shimizu H, Tomomasa H, et al: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in bladder cancer. *Urol Int* 2002; 68(2): 122–125.
- Hirano Y, Takayama T, Kageyama S, Ushiyama T, Suzuki K, Fujita, K: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma: relationship between histological parameters and chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Eur Urol* 2003; 43(1): 45–52.
- Haaz MC, Fishel JL, Formento P, René N, Etienne MC, Milano G: Impact of different fluorouracil biochemical modulators on cellular dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38, 52–58.
- Meropol NJ: Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 1998; 34(10): 1509–1513.
- Saleem A, Yap J, Osman S, Brady F, Suttle B, Lucas SV, et al: Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in-vivo imaging of drug action. *Lancet* 2000; 355: 2125–2131.
- Hirata K, Horikoshi N, Aiba K, Okazaki M, Denno R, Sasaki K, et al: Pharmacokinetic study of S-1, a novel oral fluorouracil antitumor drug. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2000–2005.
- Yoneda K, Samoto T, Ueba E, Osaki T: The inhibitory action of BOF-A2, a 5-fluorouracil derivative, on squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 1999; 137: 17–25.
- McClellan S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM: Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends in Molecular Biology* 2003; 9(5): 189–195.
- Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29: 23–39.
- Crowther JR: The ELISA Guidebook. *Methods in molecular biology*, volume 149. Humana Press Inc, 2000.