

Farmakokinetisk betydning av
sekvensvarianter i *CYP3A4*, *CYP3A5*,
POR og *PPARA*

Miriam Dahl



Mastergradsoppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Farmakokinetisk betydning av sekvensvarianter i *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR* og *PPARA*

Miriam Dahl

Mastergradsoppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere:

Professor Hege Christensen, Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, UiO

Professor Anders Åsberg, Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, UiO

Stipendiat Ingrid Lunde, Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, UiO

Copyright Forfatter

År 2013

Tittel Farmakokinetisk betydning av sekvensvarianter i *CYP3A4*, *CYP3A5*, *POR* og *PPARA*

Forfatter Miriam Dahl

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, under veiledning av professor Hege Christensen, professor Anders Åsberg, og stipendiat Ingrid Lunde. Arbeidet ble påbegynt august 2012 og avsluttet mai 2013.

Først og fremst vil jeg takke Hege Christensen for fantastisk veiledning og oppfølging gjennom hele masteroppgaven, og spesielt den siste måneden. Du har et utrolig smittende engasjement og en positiv innstilling til det meste, og samme hvor motløs jeg var før jeg banket på din dør så forlot jeg alltid kontoret ditt med nytt pågangsmot. Jeg vil også takke for alle tilbakemeldinger og konstruktive kritikk som har gjort dette til et spennende og lærerikt år, og ikke minst morsomt. Vil til slutt også takke for alle både faglige, og ikke fullt så faglige kaffepauser rundt omkring i 4. Etasje ☺

Jeg vil også takke Beata Mohebi for all hjelp og veiledning i forbindelse med metodeutvikling, samt all praktisk hjelp og opplæring under laboratoriearbeidet. Du er en helt på laben, og jeg har lært utrolig mye av deg. Du er en helt fantastisk person, med løsninger og betryggende ord i de fleste "PCR-kriser". Jeg hadde ikke klart meg uten deg dette året. I tillegg vil jeg også takke Ingrid Lunde for all hjelp og samarbeid på laben, og for god veiledning nå i sluttinnspurten, du er grundig som få, og det setter jeg stor pris på. Jeg er veldig takknemlig for at du kom dalende inn på avdelingen i november, og jeg må også takke for mange hyggelige stunder med både joggesko og ski på beina.

Jeg retter også en takk til Sara Bremer og Stein Bergan ved rikshospitalet for all hjelp, og samarbeid i forbindelse med de nyretransplanterte pasientene. Takker også professor Anders Åsberg, overlege Karsten Midtvedt ved Rikshospitalet og overlege Rune Sandbu ved Sykehuset i Vestfold som alle har gjort denne studien mulig. Jeg må også rette en stor takk til Eva Skovlund for all hjelp med statistikk, og jeg kan med en P-verdi $<0,00000001$ si at du er den glupeste statistikeren jeg har vært i kontakt med.

Jeg vil også takke mine medstudenter for mange både faglige- og ikke-faglige samtaler, samt utallige kaffepauser. Takk til kinetikkgruppa generelt inkludert Siri, Ida og Monica for gode råd når det har trengs. Takk til Hanne for å ha lest korrektur og sist men ikke minst en takk til venner og familie, samt min forlovede, for støtte og avkoblende fritidssystemer underveis. Dette har definitivt vært det beste av fem ellers fantastiske år på FI.

Blindern, Oslo, 8.mai 2013

Miriam Dahl

Forkortelser

A	Adenin
AUC	Areal under plasma-konsentrasjons-tidskurven
BMI	Kroppsmasseindeks (Body Mass Index)
Bp	Basepar
BPD-DS	Biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling
C	Cytosin
C ₀	Konsentrasjon rett før neste dose
CAH	Congenital adrenal hyperplasi
CAR	Konstitutiv androstan reseptor
C/D ratio	Dosejustert konsentrasjon
CL	”Clearance”
CL _{int}	Clearance intrinsic
CNI	Calcineurininhibitor
CYP	Cytokrom P450
dH ₂ O	DEPC-behandlet vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Nukleotider
dsDNA	Dobbeltrådig DNA
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FMN	Flavin mononukleotid
FMO	Flavin-inneholdende monooksygenase
G	Guanin
GBP	Gastrisk bypass
GST	Glutation-S-transferase
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	3-hydrokxy-3-metyl glutaryl koenzym A
IL-2	Interleukin-2
K _{el}	Eliminasjonskonstant
LDL	Low-density lipoprotein
MAO	Monoaminoksidase

MDZ	Midazolam
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAT	N-acetyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-AT	Nukleær faktor i aktiverte T-celler
OATP	Organisk anion transportør
PCO	Polycystisk ovariesyndrom
PCR	Polymerase kjedereaksjon
P-gp	Permeabilitetsglykoprotein
POR	Cytokrom P450 oksidoreduktase
PPAR	Peroksisom proliferatoraktivert reseptor
PPRE	Peroksisom proliferator responselement
PXR	Pregnan X reseptor
REK	regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RFLP	Restriksjonsfragmentlengdepolymerfisme
RXR	Retinoid X reseptor
SNP	Enkeltnukleotidpolymorfismer
ssDNA	Enkeltrådig DNA
SULT	Sulfotransferaser
T	Tyrosin
TBS	Tris-bufret saltvannsløsning
T _{1/2}	Halveringstid
UGT	Uridin difosfat (UDP)-glukuronosyltransferase
UV-lys	Ultrafiolett lys
VAR	Variant
VNTR	Variable antall tandem-repetisjoner
VT	Villtype

Sammendrag

Introduksjon og problemstilling: Cytokrom P450 (CYP)-enzymet CYP3A4 er det kvantitativt viktigste fase 1-enzymet for legemiddelmetabolisme i lever og tarm. Interindividuell forskjell i uttrykk og aktivitet av enzymet gjør at systemisk eksponering av legemidler som metaboliseres av CYP3A4 varierer fra person til person. Genetisk variasjon i CYP3A4 og andre proteiner assosiert med CYP-aktivitet (elektronendonoren cytokrom P450 oksidoreduktase (POR), transkripsjonsfaktoren peroksisom proliferator-aktivert reseptor α (PPAR α)) er nylig vist å ha en sammenheng med metabolisme via CYP3A4. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle metoder for genotyping av *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*. Videre skulle betydningen av disse sekvensvariantene studeres i forhold til variasjoner i farmakokinetiske parametere for takrolimus og atorvastatin i henholdsvis nyretransplanterte- og sykkelig overvektige pasienter.

Metode: DNA ble isolert fra fullblodsprøver, og de ønskede sekvensene ble amplifisert ved PCR. Genotyping av *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* ble utført ved kutting med restriksjonsenzymmer og elektroforese i 3 % agarosegel. Lengden av PCR-produktene, ble estimert ut fra samtidig analyse av markører med DNA-fragmenter med kjent lengde.

Resultater: Det har blitt utviklet metoder til genotyping av *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*, og metodenes spesifisitet ble bekreftet ved sekvensering. Det var tilsvarende allelfrekvenser (28 og 29%) for *PPARA(48)* i begge populasjonene. C/D ratio for takrolimus var statistisk signifikant høyere i bærere av *PPARA(42)* og *PPARA(48)* variantallel sammenlignet med bærere av villtypeallel (P=0,024, P=0,012). Tilsvarende hadde bærere av minst ett variantallel for begge disse sekvensvariantene 40% lavere CL/F av atorvastatinlaktone. Uttrykk av CYP3A4 i tarm var statistisk signifikant lavere (88%, P=0,01) i den kombinerte gruppen med homo- og heterozygote bærere av *PPARA(48)* sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet. For *POR*28* var allelfrekvensen 30- og 50% i henholdsvis de nyretransplanterte- og de sykkelig overvektige pasientene. C/D ratio for takrolimus var statistisk signifikant lavere i den kombinerte gruppen med hetero- og homozygote *POR*28*-bærere sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallel uavhengig av *PPARA(48)*- og *CYP3A5*-genotype (P=0,039). C/D ratio var også statistisk signifikant lavere (60%, P<0,001) i pasienter som uttrykker CYP3A5 sammenlignet med de som ikke uttrykker CYP3A5.

Konklusjon: I tillegg til *CYP3A5*-genotype ble *PPARA(42)/(48)* funnet å være av størst betydning for dosejustert takrolimuskonsentrasjon hos nyretransplanterte pasienter. Sammenhengen mellom *PPARA(42)/(48)* og proteinuttrykk av *CYP3A4* i de sykkelig overvektige pasientene kan muligens forklare den lavere CL/F av atorvastatinlaktonet som ble observert i bærere av *PPARA(42)/(48)*. Ytterligere studier må til for å evaluere hvorvidt genotyping av disse sekvensvariantene kan bidra til å optimalisere individualisert legemiddelterapi.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	2
1.1	Legemiddelmetabolisme	2
1.2	Cytokrom P450 enzymsystemet	2
1.3	Cytokrom P4503A	3
1.3.1	CYP3A4	5
1.3.2	CYP3A5	5
1.4	Cytokrom P450 oksidoreduktase	5
1.5	Peroxisom proliferator-aktivert reseptor α (PPAR α)	9
1.6	Interindividuell variasjon	10
1.6.1	Variasjon i CYP3A4	11
1.6.2	Variasjon i CYP3A5	12
1.6.3	Variasjon i POR	13
1.6.4	PPARA rs 4253728 (42) og rs 48236113 (48)	16
1.7	Substrater som metaboliseres av CYP3A	17
1.7.1	Takrolimus	17
1.7.2	Atorvastatin	17
1.8	Metoder benyttet ved genotyping	19
1.8.1	PCR	19
1.8.2	Kutting med restriksjonsenzym	21
1.8.3	Gelelektroforese	22
1.9	Hensikten med oppgaven	22
2	Materialer	23
2.1	Utstyrliste	23
2.2	Reagenser	24
2.3	Løsninger	25
2.4	Pasientmateriale	26
2.4.1	Nyretransplanterte pasienter	26
2.4.2	Sykelig overvektige pasienter	26
3	Metoder	28
3.1	Isolering av DNA	28
3.2	Metodeutvikling	29
3.2.1	Valg av primer	29
3.2.2	Valg av restriksjonsenzym	29
3.2.3	Optimalisering av PCR-betingelser	31
3.2.4	PCR	32
3.2.5	DNA-gelelektroforese	33
3.2.6	Kutting med restriksjonsenzym	34
3.3	Genotyping av pasienter	36
3.4	Databearbeidelse og statistiske analyser	37
4	Resultater	38
4.1	Metodeutvikling	38
4.1.1	Valg av primer	38
4.1.2	Valg av restriksjonsenzym	39
4.1.3	Optimalisering av PCR-betingelser	40
4.1.4	Kutting med restriksjonsenzym	45

4.1.5	Sekvensering.....	49
4.2	Genotyping av pasienter	49
4.2.1	Nyretransplanterte pasienter	49
4.2.2	Sykelig overvektige pasienter.....	50
4.3	Databearbeidelse og statistiske analyser.....	51
4.3.1	Sammenheng mellom <i>PPARA(42)</i> , <i>PPARA(48)</i> , <i>POR*28</i> , <i>CYP3A5*3</i> og <i>CYP3A4*22</i> genotype og dosejusterte takrolimuskonsentrasjoner i nyretransplanterte pasienter	51
4.3.2	Farmakokinetikk for atorvastatin i sykelig overvektige.....	54
4.3.3	Sammenheng mellom <i>PPARA(42)</i> , <i>PPARA(48)</i> , <i>POR*28</i> og <i>CYP3A5*3</i> genotype og farmakokinetiske variabler i sykelig overvektige pasienter.....	55
4.3.4	Sammenheng mellom <i>PPARA(42)</i> , <i>PPARA(48)</i> , <i>POR*28</i> og <i>CYP3A5*3</i> genotype og proteinuttrykk av <i>CYP3A4</i> i lever og tarm i sykelig overvektige pasienter	58
4.3.5	Sammenheng mellom <i>PPARA(42)</i> , <i>PPARA(48)</i> og <i>POR*28</i> og BMI i sykelig overvektige pasienter.....	61
5	Diskusjon.....	62
	<i>Metodeutvikling.....</i>	<i>62</i>
	<i>Farmakokinetisk betydning av PPARA(42) og PPARA(48).....</i>	<i>62</i>
	<i>Farmakokinetisk betydning av POR*28.....</i>	<i>66</i>
	<i>Farmakokinetisk betydning av CYP3A5*3 og CYP3A4*22</i>	<i>68</i>
6	Konklusjon.....	69
	Litteraturliste	70
	Vedlegg.....	81
	Vedlegg 1. Utskrift fra NebCutter	81
	Vedlegg 2. Tabeller med temperatur og konsentrasjonsbetingelser benyttet under optimalisering av PCR.....	83
	Vedlegg 3. Mengdeforhold av reagenser ved bruk av PCR.....	87

1 Introduksjon

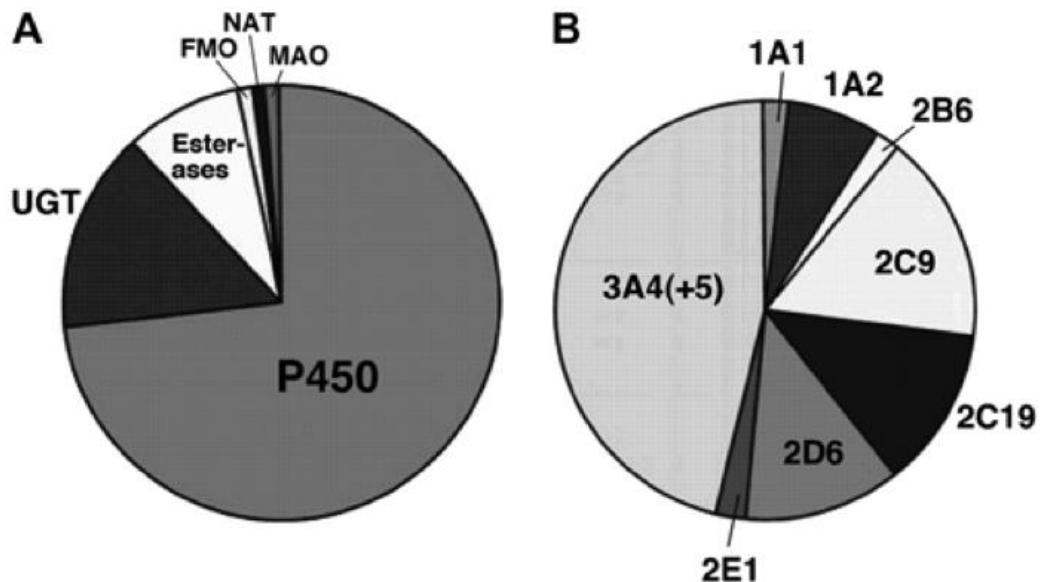
1.1 Legemiddelmetabolisme

Metabolisme er kroppens måte å gjøre hydrofobe, upolare stoffer mer polare og hydrofile slik at de lettere kan skilles ut via nyrene, og på denne måten unngå toksisitet. Metabolisme kan deles inn i fase I- og fase II-reaksjoner, hvor fase I omfatter oksidering, reduksjon og hydrolyse, mens fase II hovedsakelig er konjugeringsreaksjoner. Fase II-metabolisme resulterer ofte i økt vannløselighet og molekylvekt, som videre fremmer utskillelse av de ulike stoffene. Oksidasjon av legemidler foregår hovedsakelig via cytokrom P450 (CYP)-enzymet og medfører modifisering av substratet ved å inkorporere en funksjonell gruppe eller fjerne en metylgruppe. Slike reaksjoner fører ofte til inaktivering av legemiddelet, men kan også generere aktive, toksiske og karsinogene metabolitter, samt bioaktivering av legemidler som inntas i inaktiv form (prodrugs). Fase II-reaksjoner utføres av flere ulike superfamilier med konjugerende enzymer. Blant de viktigste er glutation-S-transferase (GST), Uridin difosfat (UDP)-glukuronosyltransferaser (UGT) og sulfotransferaser (SULT). Eksempel på en konjugerings-reaksjon er dannelsen av glukuronider ved overføring av glukuronsyre fra UGT til ulike substrat, som ofte er produkter fra fase I-metabolisme. De ulike metaboliserende enzymene i kroppen finnes i de fleste vev, men er mest uttalt i lever og tarm. CYP- og UGT-enzymet er de kvantitativt viktigste metaboliserende enzymene i kroppen, med hovedansvar for henholdsvis fase I og fase II reaksjoner (Figur 1A) [1].

1.2 Cytokrom P450 enzymsystemet

CYP-enzymene regnes som det viktigste enzymsystemet for metabolisme av legemidler og xenobiotika. Felles for alle CYP-enzymet er at de inneholder en heme-gruppe, og katalyserer flere ulike oksidative reaksjoner [2]. Det er per i dag blitt identifisert 57 funksjonelle CYP-gener som koder for ulike CYP-enzymet [3]. De fleste er involvert i metabolisme og biosyntese av steroider, kolesterol, fettsyrer og eikosanoide. Omtrent 15 av CYP-enzymene er involvert i metabolisme av legemidler og xenobiotika, mens det i tillegg finnes 15 "orphan" CYP-enzymet hvis funksjon foreløpig er ukjent [2]. CYP-enzymene er en gruppe beslektede, enzymet som plasseres i undergrupper basert på aminosyresekvenslikhet. Nomenklaturen starter alltid med CYP, en forkortelse for cytokrom P450 etterfulgt av et arabisk tall som uttrykker type familie, deretter en bokstav som representerer underfamilie,

før det til slutt oppgis et tall som viser til CYP-isoform [4]. Navnet CYP3A4 forteller oss at det er et cytokrom P450 enzym i 3 familien, innen underfamilie A og med gnummer 4 [1]. Isoenzymene CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 og CYP2D6 er hovedansvarlig for metabolisme av legemidler (Figur 1B) [5, 6].



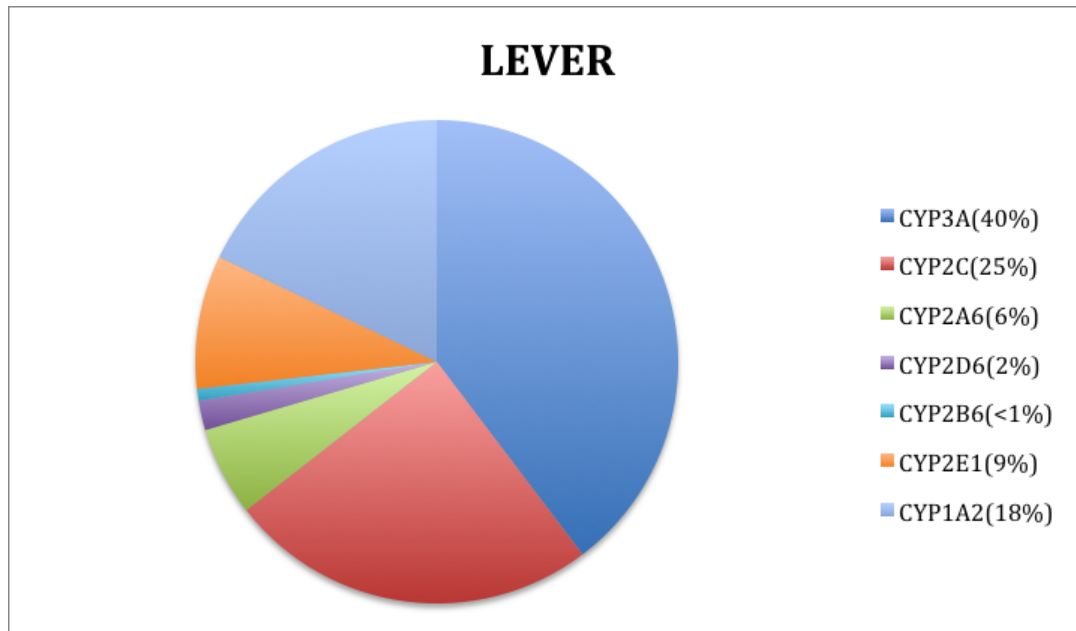
Figur 1. A. Ulike enzymeres bidrag til metabolisme av markedsførte legemidler. B. Bidrag fra ulike CYP-isoenzymer ved CYP-mediert legemiddelmetabolisme. UGT: UDP-glukuronosyltransferaser, FMO; Flavin-inneholdende monooxygenase, NAT; N-acetyltransferase, MAO; monoamin oksidase, P450; Cytokrom P450 [3].

CYP-enzymene er som tidligere nevnt mest uttalt i lever og tarm, men finnes også i andre vev som lunger, nyre og sentralnervesystem [7]. Enzymene er membranbundne proteiner, hovedsakelig lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) [8]. De har ulik substratspesifisitet [9], men det forekommer overlappning ved at samme substrat i større eller mindre grad metaboliseres av flere ulike enzymer [10].

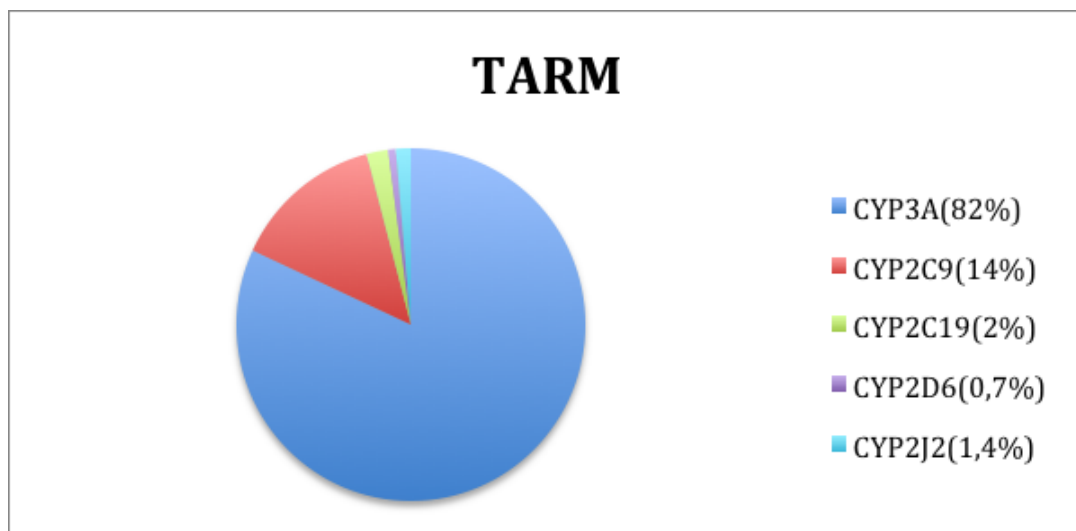
1.3 Cytokrom P4503A

CYP3A, den kvantitativt viktigste underfamilien innen CYP, utgjør omtrent 40% og 80% av total mengde CYP i henholdsvis lever (Figur 2) [6, 11] og tarm (Figur 3) [11], det viktigste ekstrahepatiske organet for legemiddelmetabolisme [12]. CYP3A-underfamilien er ansvarlig for 80% av all oksidativ metabolisme, og katalyserer metabolismen av over 50% av dagens

markedsførte legemidler. De er i tillegg involverte i metabolisme av blant annet steroidhormoner, toksiner og karsinogener [13]. Den betydelige mengden CYP3A-enzymet i lever og tarm medvirker til effektiv first pass metabolisme av legemidler [10].



Figur 2. Kvantitativ fordeling av cytokrom P450 enzymer i lever [6].



Figur 3. Kvantitativ fordeling av cytokrom P450 enzymer i tarm [11].

CYP3A-underfamilien består av fire isoenzymer: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 [14]. CYP3A4 og CYP3A5 har størst betydning med hensyn på legemiddel-metabolisme [10]. Nivået av CYP3A43 i lever er derimot lavt, og har liten betydning for

metabolisme av legemidler [14]. CYP3A7, tidligere antatt å kun være tilstede i lever hos fostre [15], er senere funnet i lever hos 50% av den voksne populasjonen. Den kliniske betydningen av dette isoenzymet er imidlertid lav i forhold til total hepatisk CYP3A-aktivitet [16].

1.3.1 CYP3A4

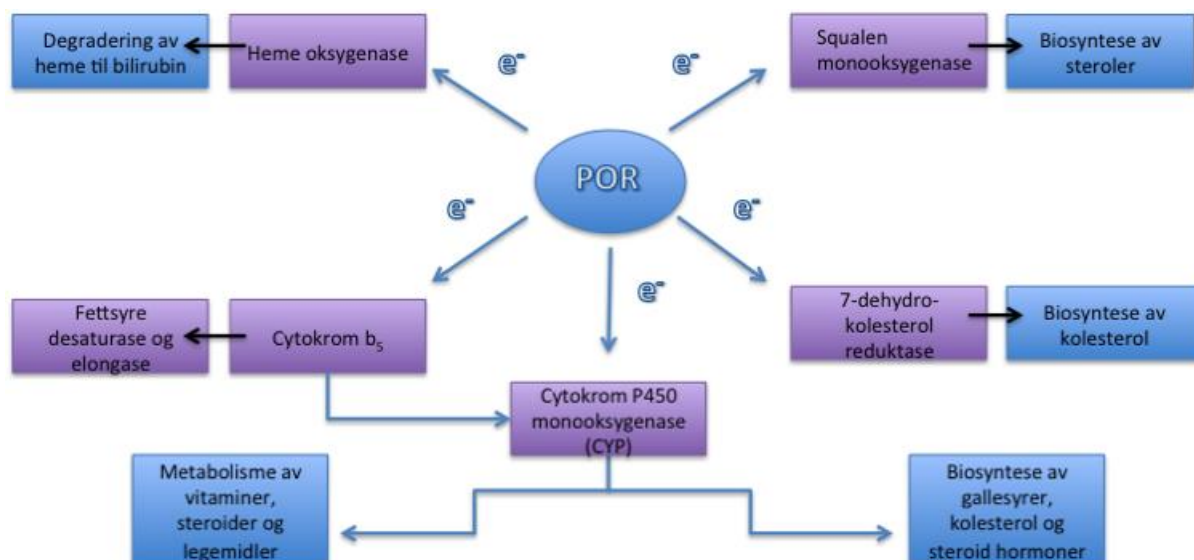
CYP3A4 utgjør gjennomsnittlig 95% av total mengde CYP3A-mRNA i lever [17], og er som tidligere nevnt det kvantitativt viktigste fase I-metaboliserende enzymet i kroppen [6]. Enzymet har et stort aktivt sete, hvilket muliggjør binding og metabolisme av mange strukturelt ulike substrater, inkludert flere vanlig brukte legemidler. I enkelte tilfeller kan flere molekyler oksideres samtidig [8].

1.3.2 CYP3A5

CYP3A5 har i overkant av 80% sekvenslikhet med *CYP3A4* [14], og det kan derfor være overlappende substratspesifisitet mellom de to isoenzymene. Ulike studier har vist både høyere, lik og lavere aktivitet av CYP3A5 sammenlignet med CYP3A4, avhengig av testsubstrat. Økt metabolisme av takrolimus er vist hos de som uttrykker CYP3A5 [18, 19]. CYP3A5 er det CYP-enzymet med størst forekomst i vev utenom lever og tarm, og uttrykkes blant annet i nyrer, binyrer og lunger. CYP3A5 kan derfor ha en viktig regulatorisk rolle for blant annet steroidhormoner i ekstrahepatisk og ekstraintestinalt vev [20, 21].

1.4 Cytokrom P450 oksidoreduktase

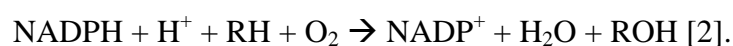
Cytokrom P450 oksidoreduktase (POR) donerer elektroner til flere ulike oksygenaser i ER (Figur 4), blant annet heme oksygenase [22], squalen monooksygenase [23], 7-dehydrokolesterol reduktase [24], cytokrom b₅ [25], og samtlige CYP-enzymmer [26]. De steroidogene CYP-enzymene P450c17 (17 α -hydroksylase/17-20 lyase, CYP17A1), P450c21 (21-hydroksylase/CYP21A2) og P450aro (aromatase, CYP19) er også avhengige av funksjonell POR for tilstrekkelig metabolsk aktivitet [27].

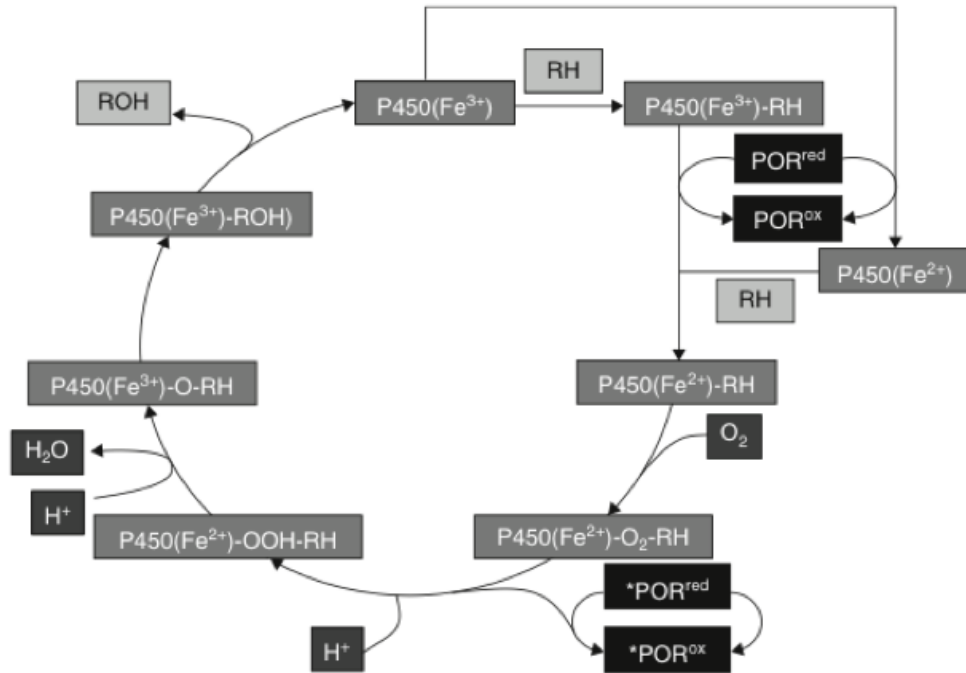


Figur 4. Cytokrom P450 oksidoreduktase (POR) som elektrondonor i ulike fysiologiske prosesser via ulike elektronakseptorer (markert lilla) [28].

PORs rolle i CYP-mediert metabolisme ble først beskrevet av Lu og Coon på slutten av 60-tallet [29]. Det er foreløpig ikke kjent hvilket forhold mellom POR og CYP-enzymene som gir best metabolisme. Det har derimot vært rapportert et gjennomsnittlig POR/CYP3A-forhold på 1:4 i humane levermikrosomer. Forholdet vil imidlertid være ulikt for de enkelte CYP-enzymene [30].

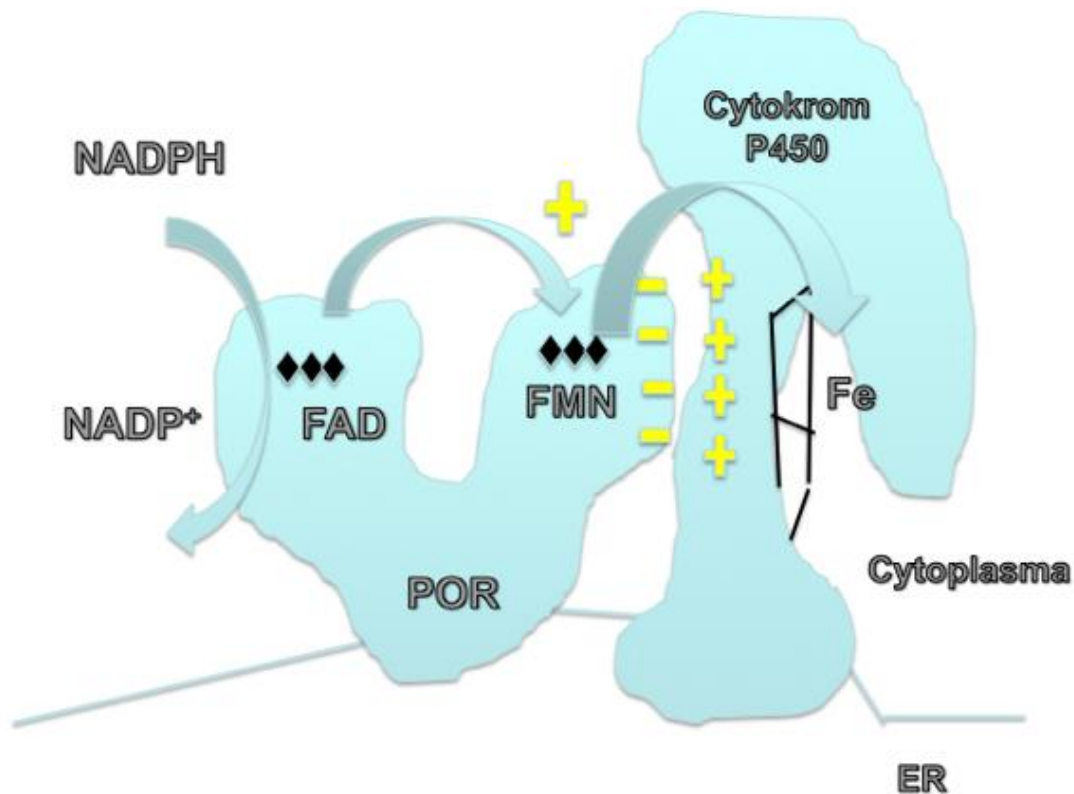
Metabolismen av ulike substrater foregår i en syklus som starter ved at substratet bindes til enzymet (Figur 5). Etter binding av substrat vil Fe^{3+} reduseres til Fe^{2+} ved tilførsel av et elektron fra POR. I neste trinn bindes molekylært oksygen (O_2) til enzymet, og vi får dannet et Fe^{2+}O_2 substratkompleks. Komplekset mottar så nok et elektron fra POR (eventuelt cytochrom b_5), i tillegg til et proton, og det dannes et Fe^{2+}OOH kompleks. Tilførsel av ytterligere ett proton bidrar til at O-O bindingen kløyves og det dannes vann og et $(\text{FeO})^{3+}$ substratkompleks. FeO^{3+} mottar deretter et hydrogenatom fra substratet og det dannes frie radikaler, i tillegg til det oksiderte produktet som frigjøres fra komplekset. CYP-enzymet blir resirkulert, og går tilbake til sin opprinnelige form med Fe^{3+} . Den katalytiske syklusen kan da starte på nytt [5, 8, 31]. Den overordnede reaksjonen, hvor RH er substrat og ROH er produktet av oksidasjonen, kan sammenfattes av følgende reaksjonslikning:





Figur 5. PORs rolle som elektrondonor i katalytisk syklus for CYP-mediert legemiddel-oksidasjon. POR; Cytokrom P450 oksidoreduktase, RH; substrat, ROH; produkt av oksidasjonen [28].

POR består av fem strukturelle domener hvorav tre er bindingsdomener for henholdsvis nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i redusert form, flavin adenin dinukleotid (FAD) og flavin mononukleotid (FMN) (Figur 6). NADPH bindes til POR før den deretter donerer et hydridion (H^-) til FAD [28, 32]. Elektroner (overført fra $NADP^+$ til FAD) overføres fra FAD til FMN [33]. POR returnerer deretter til sin initiale konformasjon og donerer elektroner til mottaker-enzymene. POR utviser stor strukturell fleksibilitet under elektronoverføring, og kan dermed katalysere oksidasjonen av flere ulike substrater [28, 32].



Figur 6. Illustrasjon av sammenhengen mellom elektrondonoren cytokrom P450 oksidoreduktase (POR) og et CYP-enzym. NADPH; Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, POR; Cytokrom P450 oksidoreduktase, FAD; Flavin adenin dinukleotid, FMN; Flavin mononukleotid, ER; endoplasmatisk retikulum. Figuren er modifisert fra Huang et al. [34].

Genet som koder for human POR (78 kDa) er lokalisert på kromosom 7, og inneholder 16 exons [28, 35]. PORs sentrale rolle *in vivo* bekreftes av embryodødelighet i POR-knockout mus [36, 37]. Leverspesifikk knockout av POR-genet i mus er derimot vist å være forenlig med liv, hvilket indikerer fungerende ekstrahepatisk POR [38]. Det ble imidlertid observert kraftig nedsatt metabolisme av steroider og legemidler ved ikke-funksjonell POR i lever. En fem ganger kompensatorisk økning i total mengde CYP, trolig forårsaket av en negativ feedback regulering, var ikke tilstrekkelig til å motvirke nedsatt metabolismekapasitet i disse musene [38, 39].

Flere faktorer foruten CYP-enzymet selv, påvirker enzymkinetikken i *in vitro* modell-systemer, deriblant cytokrom b₅ [40], et lite membranbundet heme-protein lokalisert i ER. Cytokrom b₅ kan overføre elektroner fra POR til elektronakseptorer som for eksempel CYP-enzymmer (Figur 4) [41]. Det har vært vist at cytokrom b₅ kan effektivisere legemiddel-metabolismen *in vitro*, men påvirkningen av cytokrom b₅ er sterkt substratavhengig [42, 43].

Enkelte CYP-enzymmer, og andre spesifikke substrater er avhengig av cytokrom b₅ for å øke elektronoverføringen [41]. Det har tidligere vært vist at relativt mengdeforhold mellom cytokrom b₅ og POR vil ha avgjørende betydning for CYP-aktivitet [44]. Tilstedeværelse og økt nivå av cytokrom b₅ har i flere påfølgende studier vist økt metabolismehastighet [30, 45].

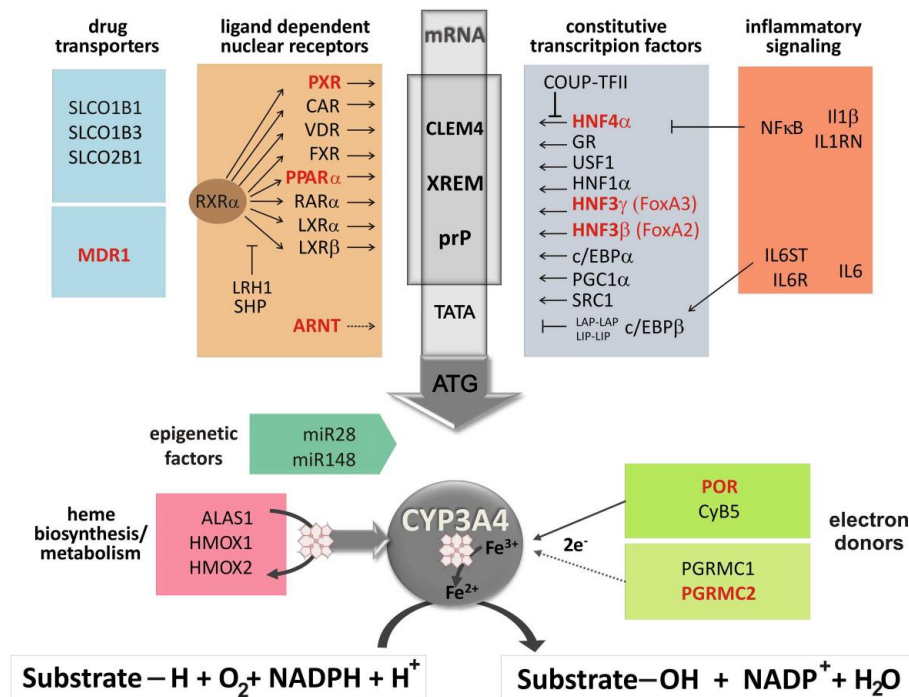
1.5 Peroxisom proliferator-aktivert reseptor α (PPAR α)

Peroxisom proliferator-aktivert reseptor α (PPAR α), også kjent som NR1C1 (kjerne reseptor 1, gruppe C, medlem 1), er en type II kjernereseptor, lokalisert i selve kjernen. Dette skiller den fra type I cytosoliske kjernereseptorer som translokaliseres til kjernen først etter binding av ligand. PPAR α uttrykkes hovedsakelig i lever, hvor den i likhet med andre PPAR (- β/δ og γ) regulerer lipidmetabolismen [46]. Den finnes også i andre vev med aktiv fettsyremetabolisme, som for eksempel hjerte, brunt fettvev, muskel og tarm [47-50].

Transkripsjonsfaktoren PPAR α , kodet for av *PPARA*, aktiveres av henholdsvis syntetiske og endogene ligander kalt peroksisom proliferatorer (Figur 7). Syntetiske ligander omfatter blant annet fibrater, legemidler benyttet ved hyperlipidemi, mens mettede og flerumettede fettsyrer, samt deres derivater, er eksempler på endogene ligander [13, 51, 52]. Aktivering av PPAR α medfører også økt energiforbrenning ved å oppregulere gener tilknyttet oksidasjon og transport av fettsyrer [52, 53]. I tillegg er PPAR α vist å være involvert ved blant annet inflammatoriske responser, hepatokarsinogenese, endringer i cellyklus og syntese av lipoproteiner [13, 54].

PPAR α danner en heterodimer med kjernereseptoren retinoid X reseptor (RXR). PPAR α /RXR heterodimer kan dannes uavhengig av ligandbinding. I fravær av ligand vil heterodimeren være tilknyttet et korepressorkompleks som inhiberer gentranskripsjon [55, 56]. Ved binding av ligand vil korepressorkomplekset frigis, samtidig som et koaktivatorkompleks bindes til promoter regionen av genet for å initiere transkripsjon [57]. Heterodimeren bindes til spesifikke DNA (deoksyribonukleinsyre) sekvenser kalt peroksisom proliferator-responselement (PPRE), og transkripsjonen av ulike gener vil enten oppreguleres eller nedreguleres [58].

PPAR α ble nylig vist å påvirke uttrykk av CYP1A1, 1A2, 2B6, 3A4 og 3A7, men ikke CYP2C9, 2C19 og 2D6 i primære humane hepatocytter [59]. Aktivering av PPAR α *in vivo*, via spesifikke endogene ligander, viste en opp til fire ganger induksjon av CYP3A4. PPAR α antas derfor å være en direkte transkripsjonell regulator for hepatisk CYP3A4. En dysfunksjonell eller nedsatt PPAR α vil derfor kunne påvirke metabolisme av substrater for enzymer som reguleres av denne transkripsjonsfaktoren [59].



Figur 7. Oversikt over den komplekse regulering av uttrykk av CYP3A4 via blant annet kjernereseptorer (markert i lysoransje boks) og POR (markert i neongrønn) [60].

1.6 Interindividuell variasjon

Det forekommer stor interindividuell variasjon i legemiddelrespons [2], og genetiske faktorer (etnisitet og genetisk polymorfisme) kan i enkelte tilfeller forklare over 50% av den variasjonen som observeres [28, 61-63]. Tvillingstudier har vist at farmakokinetiske egenskaper som legemiddelmetabolisme er arvelig [64]. Genetisk polymorfisme innebærer at to eller flere varianter (alleler) av et bestemt gen forekommer med en frekvens på minst 1% i en gitt populasjon. De inndeles i to hovedgrupper; SNP (enkelt nukleotidpolymorfismer) og VNTR (Variable antall tandem-repetisjoner). En SNP er en variasjon i DNA-sekvensen som

oppstår når et enkelt nukleotid (Adenin (A), Tyrosin (T), Cytosin (C) eller Guanin (G)) i genomet endres. En SNP kan for eksempel endre DNA-sekvensen AAGGCTAA til ATGGCTAA. VNTR skyldes ulike lengder av tandem-repeterte sekvenser i DNA, og er den vanligste formen for genetisk polymorfisme. Farmakogenetikk (læren om genetiske årsaker til variasjon i legemiddelrespons) kan bidra til optimalisering av legemiddelbruk. Det er ønskelig at det skal utvikles molekylære, diagnostiske tester for å detektere genetiske sekvensvarianter av farmakokinetisk betydning. CYP2D6 [65, 66], CYP2C9 [67, 68], og CYP2C19 [69] er eksempler på CYP-enzymene som utviser genetisk polymorfisme, noe som kan påvirke enzymets katalytiske aktivitet [66, 70]. Det forekommer i tillegg stor etnisk variasjon for de ulike polymorfe variantene [71]. CYP2D6 er ansvarlig for metabolisme av 15-25% av klinisk brukte legemidler, og dens fenotype vil avhengig av genotype resultere i nedsatt eller økt metabolisme. Dette gir økt risiko for henholdsvis toksisitet og terapivikt [72]. Individuell variasjon i evnen til å metabolisere legemidler kan også skyldes andre faktorer som miljø (kosthold, legemiddelinteraksjoner og miljøgifter), fysiologi (alder og kjønn), og sykdomsrelaterte tilstander (lever-, nyre- og hjertesykdommer, inflammasjon) Det er blant annet vist at cytokiner i forbindelse med infeksjon og inflammasjon kan påvirke uttrykk og aktivitet av flere CYP-enzymene [73-76]. CYP-enzymene som CYP1A2, CYP2E1 og CYP3A4 faller ikke under definisjonen av polymorfe enzymer, og er eksempler på enzymer hvor miljøfaktorer spiller en sentral rolle i forbindelse med variasjon [77]. Uttrykk og aktivitet av CYP3A-isoenzymene varierer kraftig fra individ til individ, i tillegg til at det er vist en klar tid- og vevsavhengig intraindividuell variasjon [63].

1.6.1 Variasjon i CYP3A4

Miljø

Det er observert en 10-100 ganger variasjon i CYP3A4-aktivitet mellom individer. Dette er en mulig forklaring på den variasjonen som observeres i legemiddelrespons for mange legemidler med standard dosering [6, 28]. Inntak av enkelte typer legemidler og matvarer kan via hemming og induksjon påvirke enzymaktiviteten til CYP3A4 [78-80]. Johannesurt, et velkjent naturlegemiddel, er en kraftig induserer av CYP3A4 [81], mens grapefruktjuice og blant annet erytromycin er vist å gi hemming [78, 80]. Farmakokinetikken kan påvirkes i form av henholdsvis økt og nedsatt clearance (CL) dersom det sammen med en induserer eller hemmer inntas et legemiddel som er substrat for CYP3A4. Motsatt effekt vil observeres dersom legemiddelet er et prodrug som er avhengig av metabolisme for aktivering [12, 82].

Genetikk

Det er funnet flere ulike sekvensvarianter av *CYP3A4*, men grunnet lav allelfrekvens (<1%) og manglende påvirkning av aktivitet *in vivo* har *CYP3A4* inntil nylig ikke vært karakterisert som et polymorft enzym [77, 83-85]. Det postuleres likevel at så mye som 90% av den interindividuelle variasjonen i *CYP3A4*-aktivitet er genetisk betinget [86]. Det ble nylig identifisert en SNP i intron 6 i *CYP3A4* (*CYP3A4*22*), som er vist å være assosiert med redusert uttrykk og aktivitet av *CYP3A4* [87]. *CYP3A4*22* har vist nedsatt metabolisme av takrolimus, og dermed økt risiko for overdosering [88]. Genotyping av *CYP3A4*22* kan være klinisk relevant med hensyn på å identifisere pasienter med risiko for overeksponering av takrolimus.

1.6.2 Variasjon i CYP3A5

CYP3A5 er genetisk polymorft, og genetikk er derfor en viktig årsak til variasjon i *CYP3A5*-aktivitet. Miljøfaktorer kan også påvirke *CYP3A5*-aktiviteten, men ikke i like stor grad som for *CYP3A4*. Det er observert stor etnisk variasjon i uttrykk av funksjonelt *CYP3A* med høyest forekomst i afrikanske amerikanere og sør-øst asiater (50%), og lavest i kaukasiere, japanere og meksikanere (30%) [20]. Bærere av villtypeallelet *CYP3A5*1* uttrykker funksjonelt *CYP3A5*-enzym. *CYP3A5*3* er den vanligste polymorfismen. En SNP i intron 3 forårsaker alternativ spleising, og inkludering av et nytt ekson (3B) som inneholder et stoppkodon. *CYP3A5*-proteinet blir dermed forkortet og inaktivt, og homozygote bærere av *CYP3A5*3* uttrykker dermed ikke funksjonelt *CYP3A5*-enzym. Den alternative spleisingen er ikke fullstendig, og lave mengder av *CYP3A5*-protein kan dermed være tilstede i *CYP3A5*3/*3* individer [20, 84]. Nivået av *CYP3A5* kan utgjøre 50% av totalt *CYP3A*-nivå i kaukasiere og afrikanske amerikanere med minst et *CYP3A5*1* allel [20]. Det er også vist at de som uttrykker *CYP3A5* har økt metabolisme av enkelte *CYP3A*-substrater sammenlignet med de som ikke uttrykker *CYP3A5*. Dette er klinisk relevant ved dosering av *CYP3A*-substrater [89, 90]. *CYP3A5* påvirkes i mindre grad enn *CYP3A4* av indukere og hemmere, og gir potensielt færre legemiddelinteraksjoner [91]. Individer som uttrykker *CYP3A5* kan ha høyere clearance og lavere biotilgjengelighet av *CYP3A*-substrater enn de som ikke uttrykker funksjonelt *CYP3A5* [20]. Dette er blant annet vist for takrolimus og flere ulike statiner [92-96]. Tilstedeværelse av minst et *CYP3A5*1* allel er den sterkeste genetiske predikatoren for takrolimuseksponering. Det er vist at homo- og heterozygote bærere av *CYP3A5*1* har

henholdsvis 36% og 59% reduksjon i dosejustert C_0 sammenlignet med homozygote bærere av *CYP3A5**3 [97-99].

1.6.3 Variasjon i POR

Det humane *POR* er genetisk polymorft [100], og inneholder bortimot 320 SNPer [28]. Det er per i dag identifisert 41 alleler, og disse forekommer i ulike deler av proteinet [34, 101]. Mutasjoner som oppstår nær bindingssteder for FMN, FAD eller NADPH påvirker aktiviteten til *POR* i større grad enn mutasjoner nær proteinets overflate. I de fleste tilfeller hvor mindre enn 50% av reduktaseaktiviteten er opprettholdt, vil mutasjonene være lokalisert nær et av de tre bindingssetene [102]. Ulike sekvensvarianter i *POR*-genet ble nylig identifisert og assosiert med en autosomal recessiv genetisk sykdom, syndromet P450 oksidoreduktase mangel [103-106]. Syndromet fører til nedsatt *CYP17*- og *CYP21*-aktivitet og påfølgende akkumulering av steroidmetabolitter. Dette kan klinisk medføre misdannede genitalier, congenital adrenal hyperplasi (CAH), Antley-Bixler syndrom og polycystisk ovarie syndrom (PCO). Det ble ikke funnet mutasjoner i *CYP17* og *CYP21* [28, 105, 107, 108], noe som resulterte i en hypotese om at mutasjonene muligens forelå i elektronendonoren *POR* [109]. Det var imidlertid Fluck et al. som først rapporterte mutasjoner i *POR*, deriblant *POR**5, i fire pasienter med forstyrret steroidogenese og Antley-Bixler syndrom [110]. Flere varianter av *POR* genet ble deretter identifisert i pasienter med lignende symptomer [105, 111, 112].

I løpet av de siste årene er det også funnet sekvensvarianter av *POR*-genet som ikke er direkte tilknyttet sykdom, deriblant *POR**28 (A503V) [102]. En 74-95% reduksjon i *POR*-uttrykk i transgene mus medførte, til tross for manglende sykdomstegn, en reduksjon i hepatisk legemiddelmetabolisme [113]. Dette indikerer at lavt nivå av *POR* også kan påvirke metabolisme i friske individer. Ytterligere 34 polymorfismer har blitt identifisert i friske frivillige personer, hvorav ni av disse ikke var beskrevet tidligere [28, 114]. *In vitro* er det observert en sammenheng mellom økt *CYP3A4*-aktivitet og økt *POR*/*CYP3A4* forhold i *Escherichia coli* membraner [115]. Sammenfallende med disse resultatene har det blitt vist at mikrosomer med likt nivå *CYP3A5* men ulik *POR*-aktivitet resulterte i forskjell i dannelsen av midazolam (MDZ) metabolitten 1'-OH MDZ. Det ble observert en lavere clearance intrinsic (Cl_{int}) i mikrosomer med lav *POR*-aktivitet. En 12 ganger forskjell i *POR*-aktivitet resulterte i en 30 ganger forskjell i estimert Cl_{int} [116].

Genotyping av 842 friske frivillige i fire etniske populasjoner avdekket ytterligere sekvensvarianter, og aktiviteten til flere av disse ble studert i fire ulike *in vitro* modeller hvor henholdsvis reduksjon av cytokrom c, oksidering av NADPH, 17alfa-hydroxylase aktivitet til P450c17 og 17,20 lyase-aktivitet til P450c17 ble benyttet som mål for aktivitet. Den katalytiske aktiviteten varierte mellom de ulike sekvensvariantene, hvilket tilsier at hver sekvensvariant må studeres individuelt med hvert CYP-enzym. Aktiviteten til *POR*28* var i liten grad redusert i alle fire enzymmodeller [34]. *POR*5* gav også nedsatt enzymaktivitet i tilsvarende enzymmodeller [105, 110, 111]. Ulike sekvensvarianter av *POR* er vist å endre interaksjonen mellom *POR* og CYP-enzym i ulik grad [117, 118]. I tillegg påvirkes enzymaktiviteten i varierende grad avhengig av substrat og CYP-enzym. En gitt sekvensvariant av *POR* kan følgelig øke enzymaktiviteten av et CYP-enzym, mens den nedsetter aktiviteten av et annet [34, 101, 105, 119].

1.6.3.1 *POR*28* (A503V)

Sekvensvarianten *POR*28* (rs1057868) er den vanligste polymorfismen i *POR*, og koder for aminosyren A503V [34]. SNPen inkluderer et nukleotidskifte fra C>T. Det er rapportert en allelfrekvens for *POR*28* på omtrent 28% [34, 89, 120-122]. Det forekommer imidlertid en viss variasjon i allelfrekvens avhengig av etnisitet [34]. *POR*28* er vist å påvirke CYP-aktivitet i ulike retninger, avhengig av både isoenzym og testsubstrat [89, 101, 120, 123]. *In vitro* studier har blant annet vist økt CYP2C19- og CYP2C9-, og nedsatt CYP1A2- og CYP2D6-aktivitet [101, 123, 124]. For CYP3A er det vist både økt og nedsatt aktivitet avhengig av testsubstrat [89, 125].

*POR*28* er vist å være assosiert med lav initial takrolimuseksponering og økt dosebehov i nyretransplanterte pasienter som uttrykker CYP3A5 [89]. Det ble derimot ikke vist tilsvarende sammenheng for pasienter som ikke uttrykker CYP3A5. Pasienter med minst ett *CYP3A5*1* allel sammen med minst et *POR*28* allel viste en 25% økning i dosebehov [89]. Disse funnene ble nylig bekreftet i en kinesisk populasjon hvor det også ble observert signifikant lavere takrolimus eksponering (AUC_{0-24} og C_{max}) i de som uttrykker CYP3A5 og har minst et *POR*28* allel [122]. Disse to studiene konkluderer med at genetisk polymorfisme i *POR*28*, i tillegg til polymorfisme i CYP3A5 kan bidra til å forklare den store interindividuelle variasjonen i takrolimuseksponering [89, 122]. Det antydes at CYP3A5 i større grad enn CYP3A4 påvirkes av *POR*28* [89, 126].

En annen studie viste 61-77% reduksjon i aktiviteten til CYP3A med testosteron og MDZ som testsubstrat. Det var derimot liten endring i aktivitet med kinidin og erytromycin som substrater [125]. MDZ er substrat for både CYP3A4 og 3A5, og reflekterer dermed total CYP3A aktivitet, mens erytromycin oksideres eksklusivt av CYP3A4 [120]. CYP3A5 katalyserer imidlertid primært dannelsen av 1-OH-MDZ, og økte C_{max} og AUC verdier av denne metabolitten i *POR*28* varianter kan derfor være assosiert med økt CYP3A5 aktivitet [126].

Det ble også nylig vist 45% nedsatt MDZ metabolisme *in vivo* i bærere av minst ett *POR*28* allel. Effekten ble, i likhet med tidligere studier, kun vist i de som uttrykker CYP3A5 [120]. Enzymaktiviteten påvirkes her i motsatt retning enn det som ble vist med takrolimus. Dette er ytterligere et bevis for hypotesen om at effekten av *POR*28* avhenger av substrat [89, 120, 122]. Disse resultatene er i kontrast til funn gjort i to tidligere kliniske studier. Oneda et al. observerte en 1,6 ganger økning i metabolisme av MDZ i *POR*28* homozygoter. Det ble imidlertid ikke tatt hensyn til CYP3A5 genotype, i tillegg til at en stor andel av pasientene samtidig brukte andre CYP3A-substrater som kan ha modifisert aktiviteten [125]. Yang et al. fant også økt CYP3A-metabolisme av MDZ *in vivo* i homozygote bærere av *POR*28* sammenlignet med *POR*28/*1* (heterozygot) og *POR*1/*1* (villtype) i friske kinesiske menn [126]. En eventuell bias i denne studien er imidlertid at kun heterozygote bærere av *POR*28* uttrykte CYP3A5, og følgelig sier studien ingenting om effekten av *POR*28* på CYP3A5 isolert.

1.6.3.2 *POR*5* (A287P)

*POR*5* er lokalisert nær bindingssetet for FMN og FAD [102], og er den vanligste sykdomsfremkallende mutasjonen i europeisk/kaukasisk populasjon [105]. Homozygote bærere av *POR*5* er preget av alvorlig POR-mangel med kliniske symptomer tilknyttet forstyrret steroidogenese [102]. *POR*5* varianten er bare funnet i kaukasiske/europeiske populasjoner, mens R457H, en annen POR mutasjon assosiert med alvorlig sykdom, er mest frekvent i japanske pasienter [102, 127]. *POR*5* har vist kraftig nedsatt CYP2C9 og CYP2D6 aktivitet med ulike testsubstrater [124], og lav CYP3A aktivitet med både testosteron, MDZ, kinidin og erytromycin som testsubstrater [125]. En annen *in vitro* studie viste henholdsvis fullstendig og 70% hemming av CYP3A4 og CYP2B6 aktivitet [128]. *POR*5* gir nedsatt CYP17A1 aktivitet mens effekten på CYP21A2 er neglisjerbar, hvilket

også bekreftes *in vivo* [117, 118]. Nedsatt metabolisme *in vivo* er også vist i henholdsvis én homozygot og én heterozygot bærer av *POR*5* variantallelet [129].

1.6.4 *PPARA* rs 4253728 (42) og rs 48236113 (48)

Genetikk antas å bidra til interindividuell variabilitet i CYP3A4. Genetisk polymorfisme i *CYP3A4* har imidlertid vært vanskelig å vise, og betydningen av variasjon i andre proteiner tilknyttet CYP3A4 har derfor vært undersøkt. Det ble nylig identifisert to SNPer i *PPARA*, *PPARA* rs 4253728(42) og *PPARA* rs 48236113(48) [130]. Homozygote bærere av disse sekvensvariantene uttrykte mindre PPAR α i lever. Det ble derimot ikke vist noen betydelig forskjell mellom heterozygote og homozygote bærere av villtypeallelet. En shRNA-mediert *PPARA* knockdown i primære humane hepatocytter viste over 50% nedregulering av både CYP3A4-mRNA og CYP3A4-aktivitet. En *in vitro* studie med 150 humane leverprøver viste også en tydelig sammenheng mellom de to sekvensvariantene og hepatisk CYP3A4-uttrykk og aktivitet. Disse funnene ble deretter bekreftet *in vivo* i 56 genotypedede frivillige individer [130].

Variasjon i CYP3A4-uttrykk og funksjon har tidligere vært knyttet opp mot kjerne reseptorene, pregnan X reseptor (PXR)- og konstitutiv androstan reseptor (CAR)-mediert geninduksjon. Flere legemidler og xenobiotika har vært vist å indirekte aktivere transkripsjon av *CYP3A4* via PXR og CAR [131, 132]. PPAR α har store strukturelle likheter med PXR og CAR hvilket støtter teorien om at PPAR α 's påvirkning av CYP3A4 skyldes endring i gentranskripsjon. De sammenkoblede *PPARA* SNPene, *PPARA* (42) og *PPARA* (48), viste seg å forklare 8-9% av variasjonen i CYP3A4-aktivitet, målt med hensyn på atorvastatin-2-hydroksylering [130]. Det har vært vist at PPAR α kan aktivere transkripsjon av PXR. Det er likevel usikkert om dette alene forklarer den sterke effekten som observeres på uttrykk av CYP3A4 [133]. PPAR α -proteinets antiinflammatoriske egenskaper er også foreslått å ha positiv påvirkning ettersom *CYP3A4*-uttrykk nedreguleres ved inflammatoriske tilstander [134, 135]. Likevel er det per i dag ikke funnet direkte bevis til å validere denne hypotesen.

1.7 Substrater som metaboliseres av CYP3A

1.7.1 Takrolimus

Takrolimus er en calcineurin inhibitor (CNI) som virker immunsupprimerende ved å hindre calcineurin-indusert aktivering av nukleær faktor i aktiverte T-celler (NF-AT). På denne måten inhiberes T-lymfocytt signaltransduksjon [136]. Takrolimus er mye brukt ved organtransplantasjon for å hindre avstøtning, og brukes ofte sammen med blant annet steroider, mykofenolat og en IL (interleukin)-2 -reseptor inhibitor [137]. Takrolimus er i likhet med andre CNI vist å være både nefro- og nevrotoksisk, men i mindre grad enn ciclosporin. Sammenlignet med ciclosporin har takrolimus også mindre negativ effekt på blodtrykk og blodlipider [138, 139]. Legemidlet har et smalt terapeutisk vindu (5-20µg/L), og det er stor både intra- og interindividuell variasjon i dosebehov [140]. For høy plasmakonsentrasjon av takrolimus vil gi økt risiko for legemidlets toksiske effekter, mens for lav plasma-konsentrasjon vil gi økt risiko for rejeksjon. Dette indikerer at terapeutisk monitorering og individualisert dosering kan være nyttig ved administrasjon av takrolimus. [89, 140].

Takrolimus metaboliseres hovedsakelig i lever til rundt 15 ulike metabolitter, hvorav 13-odemetyl-takrolimus er den viktigste [141, 142]. Renal clearance utgjør <1% av total clearance [143], og gjennomsnittlig halveringstid ($t_{1/2}$) er omtrent 12 timer [141]. Presystemisk- og systemisk clearance av takrolimus påvirkes av blant annet CYP3A4 og CYP3A5, samt legemiddeltransportøren P-glykoprotein [19, 144, 145]. I individer som uttrykker CYP3A5, er dette isoenzymet vist å muligens være av større betydning enn CYP3A4 for metabolisme av takrolimus. Dette er vist både i *in vivo* og *in vitro* studier [146, 147].

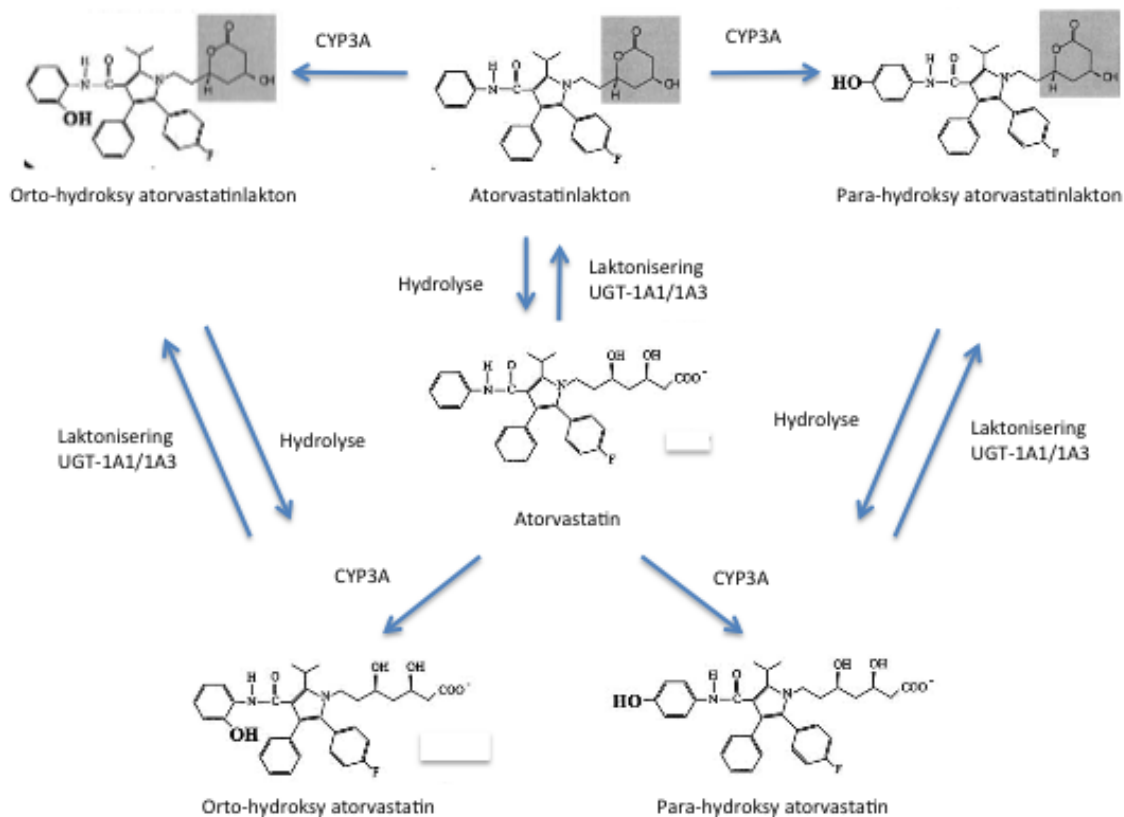
1.7.2 Atorvastatin

Det kolesterolsenkende legemidlet atorvastatin tilhører legemiddelgruppen statiner, og brukes blant annet til både primær- og sekundær forebygging av kardiovaskulær sykdom. Atorvastatin er i likhet med andre statiner, en kompetitiv hemmer av 3-hydroxy-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) reduktase, det hastighetsbestemmende enzymet i kolesterolbiosyntesen. Dette resulterer i nedsatt kolesterolsyntese og økt uttrykk av LDL- (low-density lipoprotein) reseptorer på hepatocytter. Dette fører til kraftigere LDL clearance fra blod. Atorvastatin senker mengden av totalt kolesterol, LDL-kolesterol og

triglyserider i blod, og gir i tillegg en moderat økning av det gunstige HDL-(high density lipoprotein)-kolesterolet [148, 149]. Flere kliniske studier med atorvastatin har demonstrert effektiv reduksjon av kardiovaskulære hendelser i pasienter både med [150-153] og uten kardiovaskulær sykdom [154, 155]. Det ble også vist en økt lipidsenkende effekt sammenlignet med førstegenerasjons statiner, som blant annet simvastatin [156, 157]. Atorvastatin gir også ulike pleiotrope effekter grunnet sine antioksidative [158] og antiinflammatoriske egenskaper [159].

I likhet med andre statiner er atorvastatin godt tolerert med unntak av to sjeldne, men potensielt alvorlige bivirkninger: muskelbivirkninger (varierer fra benigne myalgier til livstruende rhabdomyolyse) og forhøyede nivå av leverenzymmer. Disse bivirkningene forekommer imidlertid oftest i sammenheng med forhøyede plasmakonsentrasjoner, blant annet forårsaket av legemiddelinteraksjoner [149, 160, 161]. Det er også funnet en sammenheng mellom genetisk polymorfisme og forhøyede nivå av atorvastatin og dens metabolitter i plasma. [130, 162, 163].

Atorvastatin utsettes for kraftig first pass metabolisme, og er i tillegg substrat for P-glykoprotein i tarm og OATP1B1 i lever [148]. Dette medfører lav systemisk bio-tilgjengelighet [149]. Ved metabolisme av atorvastatin (syreform) vil det skje en laktonisering, ved at en laktongruppe tilsettes til molekylet (Figur 8). Både atorvastatin og atorvastatinlaktonet metaboliseres via CYP3A-enzymmer til aktive orto- og parahydroksylerte metabolitter. Det forekommer en kontinuerlig interkonvertering mellom syre- og laktonform for både atorvastatin og dens to metabolitter (Figur 8) [164]. Konverteringen mellom syre og lakton er mediert via UGT-1A1 og UGT-1A3 og/eller β -oksidasjon [165, 166]. Det er vist at grad av metabolisme via CYP3A varierer avhengig av substrat (lakton vs syre). Metabolisme av atorvastatinlakton til para- og ortohydroksymetabolittene er henholdsvis 83 og 20 ganger høyere enn for tilsvarende metabolisme av syren. Dette skyldes at laktonet har høyere affinitet for CYP3A4, i tillegg til at laktonet er vist å inhibere metabolisme av atorvastatinsyren [167]. Laktonenes sentrale rolle i metabolisme av atorvastatin kan forklare hvorfor hemming av CYP3A enzym ikke gir like kraftig økning i AUC for atorvastatin (3,2 ganger økning) [164] sammenlignet med tilsvarende 18,8 og >20 ganger økning i AUC for henholdsvis simvastatin og lovastatin [168, 169]. Det er derfor viktig å særskilt studere metabolisme av atorvastatinlaktonet i metabolismestudier.



Figur 8. Metabolisme av atorvastatin- syre og lakton. (CYP3A omfatter både CYP3A4 og CYP3A5) [164, 167]. UGT; Uridin difosfat glukuronosyltransferase.

1.8 Metoder benyttet ved genotyping

1.8.1 PCR

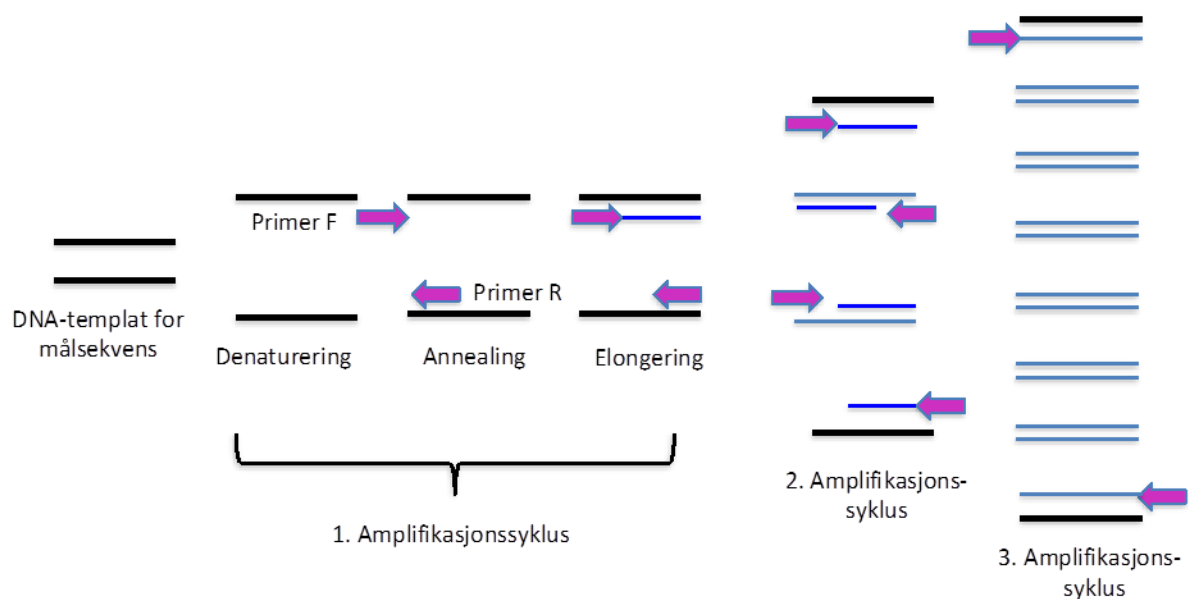
Polymerase kjedereaksjon (PCR), utviklet på 80-tallet av Kary B Mullis [170], er en mye brukt metode innen molekylærbiologi for å amplifisere en bestemt DNA sekvens [171]. Denne metoden gjør det mulig å amplifisere en spesifikk DNA-sekvens til millioner av kopier ved bruk av en varmestabil DNA-polymerase, eksempelvis Taq polymerase [172]. PCR benyttes blant annet til DNA-kloning for sekvensering, diagnostikk av arvelige og infeksiøse sykdommer og deteksjon av genetiske mutasjoner og polymorfismer [173, 174].

Viktige komponenter i en PCR reaksjon er isolert DNA, forward og reverse primere (korte DNA-fragmenter som inneholder sekvenser komplementære til DNA sekvensen som ønskes amplifisert), DNA polymerase, nukleotider og bufferkomponenter. Det er ønskelig å oppnå en selektiv amplifisering, slik at man ikke får uønskede produkter. Isolert DNA fungerer som templat for replikasjonen, og det oppstår en kjedereaksjon ved gjentatte runder av

replikasjon, hvor DNA-templatet amplifiseres eksponentielt for hver runde [175]. Hver PCR-syklus består av flere trinn med ulike temperaturbetingelser. I det første trinnet, kalt denaturering, økes temperaturen til 94-98°C i 20-30 sekunder. Den høye temperaturen medfører at hydrogenbindingene mellom DNA-trådene brytes og DNA denatureres fra dobbeltrådet DNA (dsDNA) til enkelttrådet DNA (ssDNA) (Figur 9). Guanin- og cytosininnholdet i målsekvensen er bestemmende for hvor høy temperatur som benyttes ved denaturering [175]. Reaksjonstemperaturen senkes deretter til 50-65°C i 20-40 sekunder, og tillater primerne å feste seg til hver sin komplementære DNA-tråd. Dette trinnet refereres ofte til som "annealing" eller hybridisering. Temperaturen som benyttes er 3-5°C lavere enn primernes smeltepunkt. Stabile DNA-DNA hydrogenbindinger oppstår kun der hvor primersekvensen matcher templatsekvensen. Polymerasen bindes så til primer-templat hybridet og starter dannelsen av DNA [176]. Siste del av syklusen inkluderer polymerisering (elongering). Hvilken temperatur som benyttes er avhengig av type polymerase. Taq polymerase har optimal aktivitet ved ca. 72°C [177]. DNA-polymerase syntetiserer ny DNA tråd, komplementær til DNA-templatet, ved å legge til templatets komplementære nukleotider i en 5' til 3' retning. Tiden det tar å amplifisere DNA-fragmentet avhenger av både type polymerase og optimal temperatur. Dersom det ikke foreligger noen begrensende faktorer, vil mengden DNA-target dobles for hvert elongeringstrinn, hvilket medfører en eksponentiell amplifisering av det spesifikke DNA fragmentet. Etter endt elongering gjentas de tre trinnene; denaturering, annealing og elongering. Noen ganger etterfølges siste PCR syklus med en 5-15 minutters periode med 70-74°C for å sikre at gjenstående enkelttrådig DNA blir fullstendig polymerisert [176]. Reaksjonen kjøles deretter ned til 4-15°C, og PCR-produktet kan holdes her en gitt tid dersom det er behov for korttidslagring. Hver syklus gjentas 30-40 ganger for å sikre at vi får amplifisert tilstrekkelig mengde av det ønskede DNA-fragmentet [175].

PCR er en sensitiv metode med hensyn på kontaminering, hvilket kan medføre dannelse av uønskede biprodukter. Dette kan oppstå dersom primer binder til andre steder i DNA-templatet enn den sekvensen vi ønsker amplifisert. Design av primere er derfor kritisk med hensyn på å oppnå et høyt utbytte av PCR-produkt, samt hindre uønskede biprodukter. Optimale primere har kun et bindingssete i målgenomet. Primerne bør ha en størrelse på 18-30 basepar (bp) for å oppnå adekvat selektivitet, og samtidig sørge for binding til templatsekvensen ved den valgte annealingtemperaturen. Endring av bufferkomponenter eller

polymeraseenzymer kan også bidra til å optimalisere PCR betingelsene. Optimal aktivitet av taq-polymerase er assosiert med lave magnesiumkonsentrasjoner, og en gitt pH verdi. Det er i tillegg viktig at det ikke foreligger skjev sammensetning av nukleotider [175, 178]. Manglende DNA produkt kan skyldes upassende primere, feil temperatur eller at primerne bindes til hverandre. Det kan også oppstå unøyaktighet i form av at feil base kommer inn ved polymerisering [175]. Valg av annealingtemperatur er kritisk ved bruk av PCR. Dersom annealingtemperaturen er for lav, kan det oppstå dannelse av uspesifikke produkter, mens om den er for høy, kan man risikere lavt utbytte av ønsket produkt [179]. Dannelse av ønsket PCR-produkt bekreftes ofte ved gelelektroforese [175].



Figur 9. Amplifikasjon av ønsket DNA-målsekvens ved PCR. Primer F; Forward primer, Primer R; Reverse primer.

1.8.2 Kutting med restriksjonsenzymer

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) er betegnelsen på forskjeller i DNA-sekvensen til to homologe kromosomer. Homologe kromosomer inneholder gener som koder for de samme egenskapene, og er lokalisert i samme posisjon (locus) i arvestoffet. Sekvensforskjellene kan oppdages ved hjelp RFLP-analyse, en av de tidligste og enkleste metodene for å påvise SNPer. Metoden benytter restriksjonsenzymer (restriksjonsendonukleaser) som kutter DNA ved gjenkjennelse av spesifikke, korte nukleotidsekvenser. Kuttingen resulterer i fragmenter med ulik lengde som deretter separeres ved gelelektroforese. Kuttingsmønsteret på gelen viser om enzymet har kuttet eller ikke kuttet i sekvensen. Genotypen kan

bestemmes basert på lengde og mønster av de resulterende restriksjonsfragmentene. For å benytte denne metoden, er man avhengig av at det valgte enzymet kutter nøyaktig ved SNP'en man ønsker å påvise. Selektiv kutting tilstrebes ettersom det gir en enklere og mer robust genotyping i motsetning til tilfeller hvor enzymet kutter flere steder i den valgte DNA-sekvensen. Selektiv kutting oppnås ved å benytte et fragment som kun inneholder et kuttingssete for det valgte restriksjonsenzymet, men som samtidig har tilstrekkelig størrelse til å detekteres på gel.

1.8.3 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en biokjemisk metode hvor man ved hjelp av et elektrisk felt kan separere organiske molekyler som DNA og proteiner fra hverandre basert på størrelse og ladning. Gelelektroforese av DNA foregår i en gel bestående av porer som DNA-sekvensene vandrer gjennom når det settes strøm på gelen. DNA er negativt ladet, og vil derfor vandre fra negativ til positiv pol i gelen. DNA vandrer gjennom gelen med ulik hastighet avhengig av størrelse på selve molekyl og ladning. Små molekyler beveger seg raskere enn større molekyler, og vil derfor vandre lenger i gelen i løpet av et gitt tidsrom.

Gelen inneholder et fargestoff som bindes til DNA slik at man etter elektroforesen ved hjelp av UV-lys kan detektere DNA, og estimere størrelse ved å sammenligne med en gitt standard bestående av DNA fragmenter av kjent størrelse. Valg av polymer- type og konsentrasjon avhenger av størrelsen på produktene som skal separeres og detekteres. Økt mengde polymer medvirker til bedre separasjon av små DNA-fragmenter, men prosessen tar til gjengjeld lenger tid. Det benyttes en lavere andel polymer ved separasjon av større molekyler. Agarose er en vanlig brukt polymer.

1.9 Hensikten med oppgaven

Hensikten med dette arbeidet var å optimalisere metoder til gentesting av sekvensvariantene *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*, for så å kartlegge forekomsten av disse i to ulike pasientpopulasjoner, henholdsvis nyretransplanterte pasienter og sykkelig overvektige pasienter. Betydningen av disse sekvensvariantene i forhold til variasjoner i farmakokinetiske parametre for henholdsvis takrolimus og atorvastatin i de to pasientpopulasjonene, skulle så studeres.

2 Materialer

2.1 Utstysliste

Utstyr	Produsent
UV-transilluminator	UVP, Upland, CA, USA
Elektroforesekar, Easy Cast, 100 ml	Owl separation systems, Portsmouth, NH, USA
Electrophoresis constant Power Supply EPS-600	Pharmacia Biotech
VIP 20 mikrobølgeovn	Whirlpool, Sverige
TS-100 Thermoshaker	Biosan
Mini Star Silverline	VWR international
Varmeskap	Termaks
Vekt	Sartonus Basic
DNA Engine, DYAD TM , Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad (MJ Research, Waltham, MA, USA)
2720 Thermal cycler	Applied Biosystems
Gene Quant Pro	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc., Japan
Kvarts kyvette 10 mm, 50 µl	
Dri-Block DB-2A®	Techne, Cambridge, England

2.2 Reagenser

Reagens/Kit	Produsent	Cat.nr
Track it™, 50 bp DNA Ladder, 0,1µg/µl	Invitrogen Carlsbad, CA, USA	10488-043
Generuler 100 bp Plus DNA ladder, 0,1µg/µl	Thermo Scientific	SMO323
Sea-Kem®LE Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA	50004
QIAamp® DNA blood Minikit (50)	Qiagen®	51104
PCR-reagent system	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	10198-018
GelRed™Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, CA, USA	41003
Tsel	Biolabs	R0591S
Tsp509I	Biolabs	R0576S
MspI	Biolabs	R0106S
FastDigest Tsp509I	Fermentas	FD1354
FastDigest MspI	Fermentas	FD0544
FastDigest EcoRI	Fermentas	FD0274
Forward og Reverse primere for <i>POR*5</i> , <i>POR*28</i> , <i>PPARA(42)/(48)</i>	Invitrogen	

2.3 Løsninger

Løsning 1. Fortynnet DNA-eluat

DEPC-behandlet vann	68 µl
Isolert DNA	2 µl

Løsning 2. Tris/Borat/EDTA (TBE) elektroforesebuffer

10 x TBE løsning

Tris base (890 mM)	108 g
Borsyre (890 mM)	55 g
EDTA (20 mM)	9,3 g (eventuelt 40 ml 0,5 M EDTA)
H ₂ O (destillert)	ad 1000 ml

5 x TBE løsning

Tris base (890 mM)	54 g
Borsyre (890 mM)	27,5 g
EDTA (20 mM)	4,65 g (eventuelt 40 ml 0,5 M EDTA)
H ₂ O (destillert)	ad 1000 ml

Optimal pH for TBE løsning: 8,0

Løsning 3. Orange mix

Ficoll	10 g
Orange G	0,125 g
EDTA (0,5 M)	2 ml
MQ vann	38 ml

Løsning 4: Fortynnet TBE-løsning til støping av gel

5 x TBE	40 ml
H ₂ O (destillert)	ad 2000 ml

2.4 Pasientmateriale

2.4.1 Nyretransplanterte pasienter

Totalt 136 nyretransplanterte pasienter behandlet med takrolimus, mykofenolat mofetil og steroider ble fulgt i 10-12 uker etter transplantasjon. Takrolimus ble initiert med en dose på 0.04 mg/kg to ganger daglig i forbindelse med transplantasjonen og deretter ble dosen individualisert basert på C₀ konsentrasjoner tatt opp til flere ganger per uke. Det ble i denne studien benyttet konsentrasjonsmålinger fra dag 14 eller senere etter transplantasjon og minst 3 ½ døgn etter siste dosejustering, for å være sikker på at ”steady state” er oppnådd. Takrolimus-konsentrasjoner ble målt i fullblod med standard immunoassay på Rikshospitalet. Mykofenolat mofetil ble startet med 1 g to ganger daglig og justert i forhold til eventuelle bivirkninger. I tillegg ble intravenøs metylprednisolon gitt i forbindelse med transplantasjon (250 mg), og fra dagen etter transplantasjon ble 80 mg prednisolon (oralt) gitt, med nedtrapping til 5-10 mg/dag etter 12 uker. Studien var godkjent av regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK; 2011/1739a) og alle norske relevante myndigheter. Studien ble utført i henhold til GCP (Good Clinical Practice) og Helsinkideklarasjonen, og det ble innhentet skriftlig samtykke fra alle pasientene. Blant de 123 pasientene som er inkludert i de statistiske analysene (se punkt 3.4) var det 87 menn og 36 kvinner i alderen 20-79 år med gjennomsnittsalder 48 år (20-79 år).

2.4.2 Sykelig overvektige pasienter

Den overordnede studien var designet som en åpen, kontrollert, ikke-randomisert, enkeltcenterstudie, utført i henhold til internasjonale og nasjonale lover og retningslinjer. Studien var godkjent av regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK; S-06076) og alle norske relevante myndigheter. Studien er registrert i ClinicalTrials.gov (NCT00331565). Studiepopulasjonen inkluderte 21 pasienter, videre omtalt som ”sykelig overvektige pasienter”. Demografiske data for populasjonen er vist i Tabell 1. Alle pasientene gjennomgikk tarmreducerende kirurgi. Ti av pasientene ble operert ved biliopankreatisk avledning med duodenal omkobling (BPD-DS), og 11 pasienter gjennomgikk gastrisk bypass (GBP) operasjon. Pasientene ble behandlet med 20-80 mg atorvastatin (Lipitor®) hver morgen, og ingen av dem mottok legemidler som interagerer med atorvastatin.

Farmakokinetikken til atorvastatin ble undersøkt dagen før operasjonen [180]. Blodprøver ble tatt ved tid 0 (før administrasjon av atorvastatin) og 1, 1,5, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 22 og 24 timer etter inntak av atorvastatin. Analysene ble utført med LC-MS/MS. De målte konsentrasjonene ble benyttet til beregning av ulike farmakokinetiske parametere. Beregning av AUC_{0-24} ble utført ved trapesmetoden for både atorvastatin- syre og lakton, og CI/F ble funnet ved å dividere atorvastatindosen med arealet under plasmakonsentrasjon-tids kurven (AUC_{0-24}) for henholdsvis atorvastatinsyre og atorvastatinlakton. Det ble også benyttet beregnede k_{el} verdier i statistiske analyser. Median og tilhørende spredning ble beregnet for samtlige parametere. Biopsier var tatt fra jejunum, ileum og lever i GBP pasientene og fra jejunum, ileum, duodenum og lever i BPD-DS pasientene. Uttrykk av CYP3A4 i biopsiene var tidligere bestemt ved Western blotting, og samtlige pasienter var genotypet for CYP3A5 [181]. I denne oppgaven ble 21 sykkelig overvektige pasienter genotypet med hensyn på *POR*5*, *POR*28*, *PPARA rs4253728(42)* og *PPARA rs48236113(48)*.

Tabell 1. Demografiske data for 21 sykkelig overvektige pasienter behandlet med atorvastatin.

Pasient	Kjønn	Alder(år)	BMI pre operasjon (Kg/m2)	Kirurgi	CYP3A5 genotype
2	K	51	40	GBP	0
4	M	50	34	GBP	0
5	K	47	42	GBP	0
6	M	54	34	GBP	0
7	M	54	40	GBP	0
8	K	56	45	GBP	1
9	K	64	40	GBP	0
12	K	45	55	DS	0
13	M	42	59	DS	1
14	M	43	57	DS	0
15	M	34	53	DS	0
16	K	44	51	DS	0
17	K	54	49	DS	0
18	M	31	54	DS	0
19	M	56	46	GBP	0
20	M	46	50	DS	0
21	K	29	38	GBP	0
23	K	53	52	DS	0
24	K	45	52	DS	0
25	K	59	47	GBP	1
26	K	57	40	GBP	1
Median	K=12 M=9	50	47	GBP=11 DPS =10	0 = *3/*3 = n=17 1 = *1/*3 = n= 4
Intervall		29-64	34-59		
Gjennomsnitt		48,26	46,57		
Standard avvik		9,20	7,46		
Relativt stdav		0,19	0,16		

3 Metoder

3.1 Isolering av DNA

I de sykelig overvektige pasientene ble DNA isolert fra fullblod i henhold til produktmanual for QIAamp DNA Mini kit, "Spin control". Denne prosedyren benytter sentrifugering og er egnet til isolering av totalt (genomisk, mitokondrielt og viralt) DNA fra fullblod, celler og vev. Det ble tilsatt 20 µl QIAGEN protease til 200 µl fullblod i et 1,5 ml mikrosentrifugerør. Proteasen bryter ned proteiner i prøven. Det ble deretter tilsatt 200 µl buffer AL før blandingen ble ristet og inkubert ved 56°C i 10 minutter for å oppnå lysering og DNA-ekstraksjon fra cellene. Etter tilsetning av 200 µl 96-100% etanol ble blandingen overført til en QIAamp Mini spin kolonne i et 2 ml samlerør. Blandingene ble sentrifugert ved 6000 x g i 1 minutt, før kolonnen ble overført til et rent samlerør. Løsningen ble vasket i to trinn med to ulike buffere (500 µl buffer AW1 og 500 µl buffer AW2) for å fjerne ubundet materiale som proteiner, rester av cellemembraner, strukturer som kan forstyrre PCR-reaksjonen og andre gjenværende forurensninger. For å eliminere eventuelle rester av buffer AW2, ble kolonnen plassert i et tomt samlerør og sentrifugert nok en gang på 20 000 x g i 1 minutt, før DNA ble løst i 200 µl DEPC-behandlet vann. Isolert DNA ble oppbevart i kjøleskap ved 2-8°C. Erfaringsmessig er DNA relativt stabilt og kan oppbevares minst 1 år i kjøleskap ved 4-8°C og 7 år ved -20°C. I de nyretransplanterte pasientene ble DNA isolert ved MagNA Pure LC (Sara Bremer, RH).

Utbytte av isolert DNA ble kvantifisert ved hjelp av spektrofotometri (Gene Quant Pro). Beregning av DNA-konsentrasjon ble basert på absorpsjon ved 260 nm. Instrumentet benyttet faktor 50 som basis verdi. Det ble tilsatt 70 µl av en 35 ganger fortynning av DNA-eluatet (Løsning 1). Det ble benyttet 70 µl DEPC-behandlet vann som referanse. DNA-konsentrasjon ble bestemt ved beregning som vist under. DNA-templat for samtlige pasienter ble deretter fortynnet til 50 ng/µl.

$$\text{DNA konsentrasjon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{Absorbans ved 260 nm} \times 50 \text{ (DNA faktor)} \times 35 \text{ (fortynning)}}{1000 \mu\text{l}}$$

3.2 Metodeutvikling

3.2.1 Valg av primer

Det ble valgt primere som var komplementære til hver sin ende av fragmentet som skulle amplifiseres. Valg av primer er avgjørende for hvor spesifikk PCR-reaksjonen blir. Generelle retningslinjer ved valg av primer er at det er ønskelig med primerlengde tilsvarende 17-30 nukleotider. GC båndene er sterkere enn AT båndene, og det er derfor gunstig med et GC innhold på 50-60%. Det er ikke ønskelig med en primer som inneholder en lang rekke med like nukleotider eller sekundære strukturer. Man bør unngå komplementære primere for å hindre at de binder seg til hverandre. Primere ble syntetisert av invitrogen, og oppbevart ved -20°C.

3.2.2 Valg av restriksjonsenzym

Gensekvenser og SNP informasjon for henholdsvis *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* ble hentet fra Gen Bank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Figur 10), og kuttings seter ble identifisert i de fire referansesekvensene. Sekvensene ble hver for seg analysert i dataprogrammet NEBcutter [182]. Programvaren gav forslag til ulike restriksjonszymer og hvor de kutter i referansesekvensen (Figur 11). Det ble ved hjelp av dette programmet valgt restriksjonszymer (for hver av de 4 sekvensvariantene) som spesifikt kutter i det området der nukleotidskiftet oppstår (for ytterligere figurer, se Vedlegg 1). Ulike restriksjonszymer ble testet. Lengden på amplikonene (*POR*5*, *POR*28*, *PPAR(42)*, *PPAR(48)*) ble bestemt med hensyn på å minske antall kuttings seter for de valgte restriksjonsenzymene for å oppnå selektiv kutting. Fragmentet måtte samtidig ha tilstrekkelig størrelse til å bli detektert på gelen (>100 bp).

P450 oxidoreductase POR*5_rs121912974 (exon8)

CCTTTGATGCCAAGAATCCGTTCTCTG [G/C] CTGCAGTCACCACCAACCGGAAGCT

P450 oxidoreductase POR*28_rs1057868 (exon12)

CAACTGGCTGCGGGCCAAGGAGCCTG [C/T] CGGGGAGAACGGCGGCCGTGCGCTG

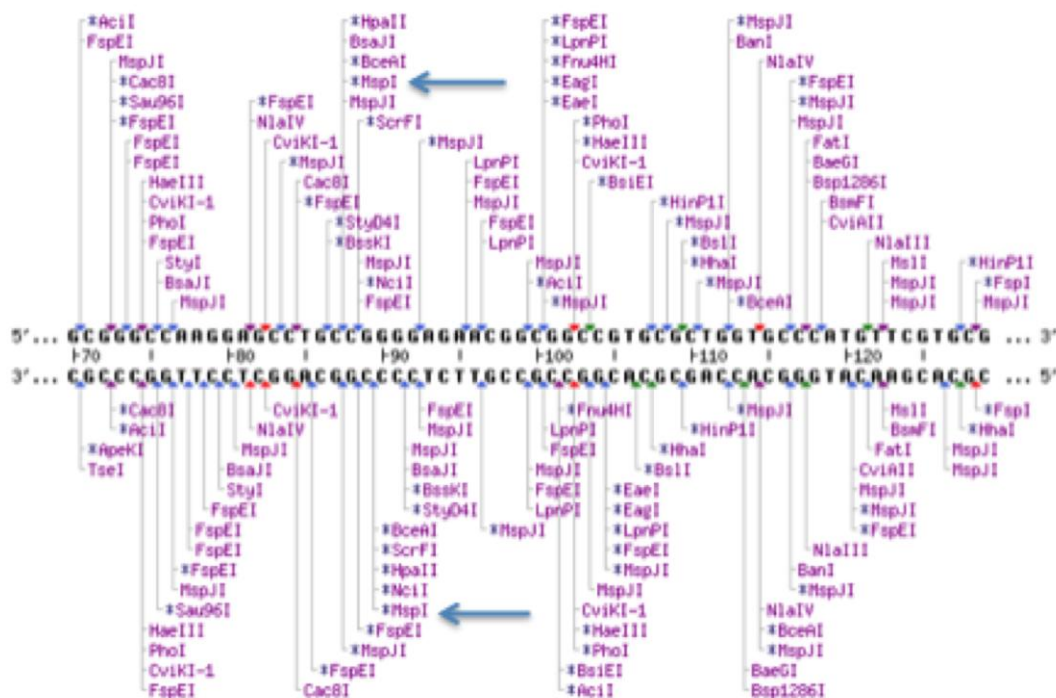
PPAR- α _rs 4253728 G/A (intron)

TGGAAGAAAGGAAGCAAACAAAACGA [G/A] TTCTGCGTGGCACTGTCAGTGC

PPARA- α _rs4823613 (intron)

ATCCATTAAAAGCCACATTTAACCCA [A/G] TTCCACAGACTGAACTGTGCTTCCC

Figur 10. Utdrag av referansesekvensene som inneholder SNPene for de respektive sekvensvariantene POR*5, POR*28, PPARA(42) og PPARA(48). SNPene er markert i rødt. Eksempelvis har det hos bærere av POR*5 forekommet et nukleotidskifte fra G til C.



MspI 5'...C I C G G...3'
3'...G G C I C...5'

Figur 11. Resultat fra NEBcutter som viser hvor (markert med piler) og hvordan (markert med rødt i utdraget av sekvensen) det valgte restriksjonsenzymet kutter i dobbeltrådet DNA for POR*28.

3.2.3 Optimalisering av PCR-betingelser

Optimalisering av temperaturbetingelser

Ulike temperaturer og varighet for annealing ble for *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* testet under optimalisering av PCR-reaksjonen. Dette ble gjort for å oppnå selektiv amplifisering av det ønskede ampliconet, og for å unngå dannelse av uspesifikke produkter. Uspesifikke produkter er uønsket ettersom det potensielt kan påvirke resultat av genotyping. For *POR*28* ble tre ulike sammensetninger av temperatur og varighet av annealing testet, henholdsvis 68°C i 20 sekunder (s), 65°C i 30 s og 62°C i 20 s. For *PPARA(42)* ble fire ulike betingelser for annealing testet; 68°C i 12 s og henholdsvis 70°C, 60°C og 62°C i 20 s. Temperatur og varighet av de øvrige trinn i PCR-reaksjonen var konstante. Oversikt over de ulike betingelsene benyttet ved optimalisering av temperatur og varighet av annealing er angitt i tabeller i Vedlegg 2. Konsentrasjonen av PCR-reagensene ble holdt konstant under optimalisering av temperaturbetingelsene for henholdsvis *POR*28* (Tabell 2) og *PPARA(42)* (Tabell 3). Kun en sammensetning av både temperaturbetingelser og reagenskonsentrasjoner ble testet for *POR*5* og *PPARA(48)*.

Tabell 2. Mengde og konsentrasjon av reagenser benyttet under optimalisering av annealingbetingelser for *POR*28*. dNTPmix; blanding av nukleotider, Primer F; forward primer, Primer R; reverse primer.

Reagens	Volum per prøve (µl)	Konsentrasjon
dH ₂ O	36,25	
PCR buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 50 mM	1,5	1,5 mM
dNTPmix 10 mM	1	0,2 mM
Primer F 20 µM	2	0,8 µM
Primer R 20 µM	2	0,8 µM
Tag Polymerase 5 U	0,25	1,25 U
DNA templat 50 ng/µl	2	0,1 µg
Total	50	

Tabell 3. Mengde og konsentrasjon av reagenser benyttet under optimalisering av annealingbetingelser for *PPARA(42)*. *dH₂O*; *DEPC*-behandlet vann, *dNTPmix*; blanding av nukleotider, *Primer F*; *forward primer*, *Primer R*; *reverse primer*.

Reagens	Volum per prøve (µl)	Konsentrasjon
dH ₂ O	36,25	
PCR buffer (10x)	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	2	0,8 µM
Primer R (20 µM)	2	0,8 µM
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25	1,25 U
DNA templat (50 ng/µl)	2	0,1 µg
Total	50	

Optimalisering av reagenskonsentrasjoner

Etter optimalisering av temperaturbetingelsene ble ulike konsentrasjoner av henholdsvis primere og magnesiumklorid testet for sekvensvariantene *POR*28* og *PPARA(42)*. Det ble utført tre parallelle forsøk hvor magnesiumkonsentrasjoner (1 mM, 1,5 mM og 2 mM) ble testet. Primerkonsentrasjoner på 0,4 µM og 0,8 µM ble testet for både forward og reverse primer i både symmetriske (lik konsentrasjon av begge primere) og asymmetriske (ulik konsentrasjon av henholdsvis forward og reverse primer) kombinasjoner ved de tre ulike magnesiumkonsentrasjonene (1 mM, 1,5 mM og 2 mM). Oversikt over de ulike kombinasjonene av reagenskonsentrasjoner benyttet under optimalisering for *POR*28* og *PPARA(42)* er angitt i tabeller i Vedlegg 2. PCR-produktene ble deretter analysert med gelelektroforese, og visualisert med UV-lampe. For *PPARA(42)* ble det i tillegg testet med primerkonsentrasjoner på 1,2 µM.

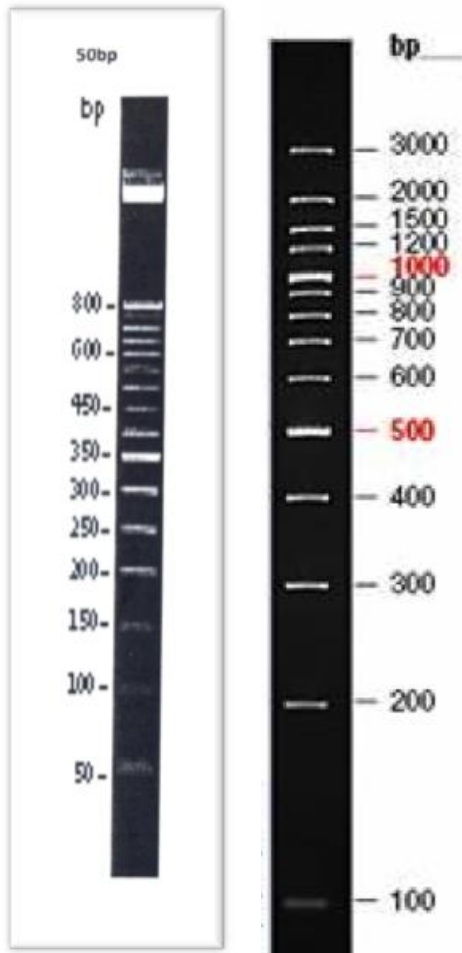
3.2.4 PCR

Ved PCR ble det benyttet et PCR-kit som inneholdt MgCl₂, nukleotider (dNTPmix), PCR-buffer og Taq polymerase (PCR-reagent system, invitrogen) i tillegg til syntetiserte primere og DEPC-behandlet vann (dH₂O). Økt mengde DNA templat ble i noen tilfeller benyttet for å øke utbyttet av PCR-produkt. De ønskede DNA sekvensene ble amplifisert ved bruk av spesifikke primere (syntetisert av Invitrogen). PCR-produktenes lengde ble estimert ut fra samtidig analyse av DNA-fragmenter med kjent lengde, og positive kontroller ved hjelp av gelelektroforese. Ulike PCR-betingelser ble benyttet ved amplifisering av de ulike sekvensvariantene med hensyn på temperatur og konsentrasjon av reagenser. Oversikt over tilsetningsrekkefølge, mengde og

reagenskonsentrasjoner benyttet ved PCR for hver av de fire sekvensvariantene er anvist i tabeller i Vedlegg 3). For sekvensvarianten *POR*28* ble betingelsene endret underveis i genotypingen. Enkelte av pasientene ble derfor analysert med andre betingelser enn de endelig optimaliserte, dette påvirket imidlertid ikke resultatet av genotypingen.

3.2.5 DNA-gelelektroforese

Agarosegel (3%) ble støpt ved å løse 3,0 g agarose i 100 ml fortynnet TBE løsning (Løsning 4) ved oppvarming i 2 minutt. Løsningen ble avkjølt og tilsatt 10 µl GelRed™. GelRed™ bindes til DNA og fører til at DNA-fragmentene blir synlige ved bestråling av UV-lys. Løsningen ble overført til en 100 ml gelform, og en eller to brønnskillere ble satt på plass avhengig av ønsket lengde på gelen. Gelen ble stående i romtemperatur i 30-60 minutter for å stivne, og ble deretter plassert i elektroforesekaret og tildekket av fortynnet TBE-løsning (Løsning 4). For å bekrefte selektiviteten til primerparene ble PCR-produktene analysert ved elektroforese. Elektroforesen ble kjørt i omtrent 1 time ved 180 V. Det ble tilsatt 5 µl av henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører ved hver analyse (Figur 12). Lengdemarkørene inneholder fragmenter med kjent størrelse og ble benyttet til å bestemme størrelsen på fragmentene. Produktene ble visualisert med UV-lys. Gelelektroforese med samme betingelser som ovenfor ble også benyttet til å bestemme størrelse på restriksjonsfragmentene etter RFLP. Isolert og rensert PCR-produkt ble sekvensert for å bekrefte at riktig område i DNA var amplifisert.



Figur 12. DNA-lengdemarkører på 50 bp og 100 bp ble benyttet som standard ved gelelektroforese. Avstanden mellom båndene i de to lengdemarkørene er henholdsvis 50 og 100 bp.

3.2.6 Kutting med restriksjonsenzymmer

PCR-produktene for de fire sekvensvariantene ble kuttet med tilhørende restriksjonsenzym (Tabell 4). Reagenser benyttet ved RFLP ble tilsatt i gitte mengder i ulike eppendorfrør (Tabell 5) for hver pasient. Restriksjonsenzymene ble aktivert ved henholdsvis 37°C (MspI, EcoRI) og 65°C (TseI, Tsp509I) (Tabell 4). For EcoRI var det nødvendig med deaktivering ved 80°C i 5 minutter. Ved RFLP-analyse av de sykkelig overvektige pasientene ble det benyttet 3 timers kutting med ordinære restriksjonsenzymmer, mens det i de nyretransplanterte pasientene ble benyttet en "FastDigest" versjon av de angitte restriksjonsenzymene. Det ble med disse enzymene oppnådd fullstendig kutting etter 5 minutt, noe som effektiviserte prosessen betydelig. FastDigest enzymene ble aktivert ved samme temperatur som de tilsvarende enzymene benyttet tidligere. Mengde reagenser ble derimot endret ved bruk av FastDigest enzymer, og det ble benyttet en FastDigest buffer (Tabell 6). Det ble kjørt

parallele forsøk i et utvalg pasienter med samtidig kutting i 3 timer og 5 minutt med henholdsvis vanlig og FastDigest enzym. Resultatet av kutting ble visualisert ved hjelp av gelelektroforese og UV-lys.

Tabell 4. Oversikt over restriksjonsenzymene, og deres tilhørende betingelser.

Enzym	Kuttingssete	Buffer	Temperatur (°C)	Tid
TseI	GC/WGC	Neb4B	65	3 t
MspI	CC/GG	Neb4B	37	3 t
MspI Fast-digest	CC/GG	FastDigest	37	5 min
Tsp509I	/AATT	Neb1	65	3 t
TspI Fast-digest	/AATT	FastDigest	65	5 min
EcoRI Fast-digest	/AATT	FastDigest		5 min

Tabell 5. Mengdeforhold av de ulike reagensene ved RFLP-analyse.

Variant	Reagens	Prøvevolum (µl)
<i>POR*5</i>	DEPC-behandlet vann	20
	Buffer (NEB4 _B)	5
	PCR-produkt	25
	Restriksjonsenzym (TseI)	0,5
<i>POR*28</i>	DEPC-behandlet vann	20
	Buffer (NEB4 _B)	5
	PCR-produkt	25
	Restriksjonsenzym (MspI)	0,5
<i>PPARA(42)/(48)</i>	DEPC-behandlet vann	20
	Buffer (NEB1 _B)	5
	PCR-produkt	25
	Restriksjonsenzym (Tsp509I)	0,5

Tabell 6. Mengdeforhold av de ulike reagensene ved RFLP-analyse med FastDigest restriksjonsenzym.

Variant	Reagent	Prøvevolum (μl)
<i>POR*28</i>	DEPC-behandlet vann	17
	Buffer (FastDigest)	2
	PCR-produkt	10
	Restriksjonsenzym (MspI, FastDigest)	1
<i>PPARA (42)</i>	DEPC-behandlet vann	17
	Buffer (FastDigest)	2
	PCR-produkt	10
	Restriksjonsenzym (EcoR1 FastDigest)	1
<i>PPARA (48)</i>	DEPC-behandlet vann	17
	Buffer (NEB1 _B)	2
	PCR-produkt	10
	Restriksjonsenzym (Tsp509I, FastDigest)	1

3.3 Genotyping av pasienter

Optimaliserte PCR-betingelser som ble benyttet under genotyping av pasienter i begge populasjoner er vist i Tabell 7-10. Restriksjonsfragmentenes lengde ble estimert ut fra samtidig analyse av DNA-fragmenter med kjent lengde (50 bp og 100 bp lengdemarkører) og positive kontroller ved hjelp av gelelektroforese. Isolert PCR-produkt fra henholdsvis en homozygot villtype og en homozygot variant for hver av sekvensvariantene *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* ble sekvensert, og genotype ble bekreftet. Kuttet DNA-sekvens fra disse pasientene ble benyttet som positive kontroller ved analyse av øvrige pasienter. Samtlige nyretransplanterte pasienter behandlet med takrolimus (n=136) ble genotypet for *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*. For *CYP3A5*3* og *CYP3A4*22* ble henholdsvis 128 og 133 nyretransplanterte pasienter genotypet (Sara Bremer, RH). Allelfrekvensen for sekvensvariantene ble beregnet. De sykkelig overvektige pasientene (n=21) ble genotypet for *POR*5*, *POR*28* og *PPARA(48)*, og allelfrekvensen ble beregnet. For *PPARA(42)* ble to pasienter ekskludert fra genotyping grunnet manglende DNA, og allelfrekvens ble derfor beregnet ut fra n=19.

3.4 Databearbeidelse og statistiske analyser

Nyretransplanterte pasienter

Fordeling og gruppering av de ulike variablene ble for hver av sekvensvariantene (*PPARA(42)*, *PPARA(48)* *POR*28*, *CYP3A5*3* og *CYP3A4*22*) studert ved hjelp av histogram og box-plot. Verdiene for dosejusterte takrolimuskonsentrasjoner (C/D-ratio) ble ln-transformert for å oppnå mer normalfordelte data.

Forholdet mellom genotype av de ulike variantene (*POR*28*, *PPARA(42)*, *PPARA(48)*, *CYP3A5*3* og *CYP3A4*22*) og takrolimuseksponering ble studert i 123 pasienter. Av de 136 pasientene som ble genotypet, ble 13 ekskludert fra statistiske analyser grunnet manglende data eller bruk av en annen formulering av takrolimus (Advagraf). C/D-ratio ble benyttet som estimat for eksponering av takrolimus. Dosejusteringen ble utført ved å dividere konsentrasjonen rett før neste dose tas (C_0) med mg inntatt dose. Det ble benyttet konsentrasjonsmålinger fra dag 14 eller senere etter transplantasjon og minst 3 ½ døgn etter siste dosejustering. Median med tilhørende konfidensintervall ble beregnet for de 123 pasientene med hensyn på C/D ratio for takrolimus. Statistiske analyser av data ble utført ved SPSS[®] (Independent-samples T-test og univariat ANOVA). Statistisk signifikans ble vist med P-verdier <0,05.

Sykkelig overvektige pasienter

Fordelingen av de kontinuerlige, farmakokinetiske variablene ble undersøkt ved hjelp av histogram og normalfordelingsplot. Sammenhengen mellom farmakokinetiske parametre (CL/F og k_{el}) for atorvastatin- syre og lakton og ulike genotyper av henholdsvis *POR*28*, *PPARA(42)*, *PPARA(48)* og *CYP3A5*3* ble estimert ved hjelp av en ikke-parametrisk Mann-Whitney U test via SPSS. Tosidig signifikansnivå ble benyttet. P<0,05 ble ansett som statistisk signifikant. CL/F og k_{el} ble brukt som estimater for metabolsk aktivitet. Det ble benyttet konsentrasjonsmålinger tatt med gitte intervall i 24 timer før kirurgi. Median og spredning ble beregnet for samtlige farmakokinetiske verdier.

Det ble benyttet statistiske tester (ikke-parametrisk Mann-Whitney U-test) for å se på sammenhengen mellom *POR*28*, *PPARA(42)*, *PPARA(48)* og *CYP3A5*3* genotype og uttrykk av *CYP3A4* i lever og tarm. Forskjell mellom grupper ble beregnet fra medianverdier i de to gruppene.

4 Resultater

4.1 Metodeutvikling

4.1.1 Valg av primer

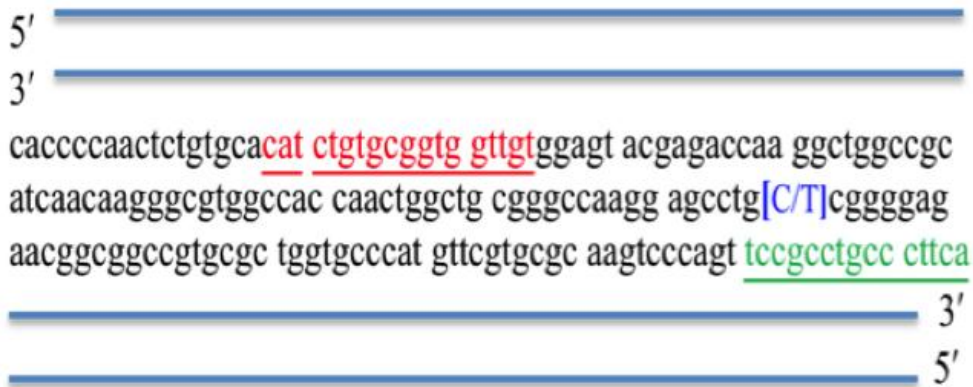
Oversikt over valgte primere for de ulike sekvensvariantene er vist nedenfor, og et utdrag fra sekvensen for *POR*28* med primere er vist i Figur 13. Fragmentlengde for *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* er henholdsvis 169 bp, 158 bp, 369 bp og 104 bp

*POR *5* A287P G>C Fragmentlengde 169 bp
Forward-POR*5F 5'-GCCGCTCACTGTGCTTCTCT -3'
Reverse-POR*5R 5'-TGACAGTGGCAGCTGGTACCT-3'

*POR *28* A503V C>T Fragmentlengde 158 bp
Forward-POR*28F 5'-CATCTGTGCGGTGGTTGT-3'
Reverse-POR*28R 5'-TGAAGGGCAGGCGGA-3'

PPARA(42) G>A Fragmentlengde 369 bp
Forward-PPARA(42) 5'-TCTCCCAGTCTGTGGCTTGT-3'
Reverse-PPARA(42) 5'-ATCTCCGGACCCACACATC-3'

PPARA(48) A>G Fragmentlengde 104 bp
Forward-PPARA(48) 5'-CTGACAGAGGTAAGGCTT-3'
Reverse-PPARA(48) 5'-ATTTAGATGGGAAGCACA-3'



Figur 13. Utdrag fra sekvensen til *POR*28*. Forward og reverse primer er markert med henholdsvis rødt og grønt, og SNPen er uthevet i blått.

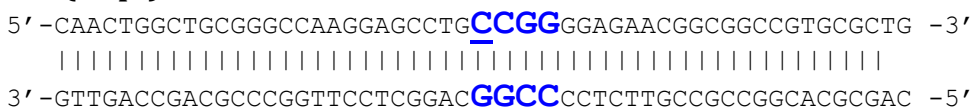
4.1.2 Valg av restriksjonsenzym

Restriksjonsenzymene *TseI*, *MspI*, *EcoRI* og *Tsp509I* ble valgt for henholdsvis *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*. De ulike kuttingssetene er markert med blått i Figur 14A-D.

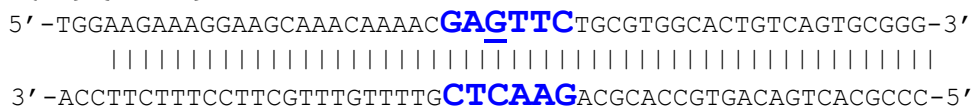
A. *POR*5* (*TseI*)



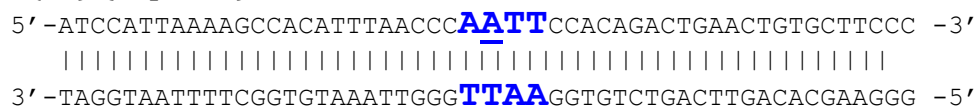
B. *POR*28* (*MspI*)



C. *PPARA(42)* (*EcoRI*)



D. *PPARA(48)* (*Tsp509I*)



Figur 14. Identifiserte kuttingsseter er markert med blått, og valgt restriksjonsenzym er spesifisert for A. *POR*5*, B. *POR*28*, C. *PPARA(42)* og D. *PPARA(48)*.

4.1.3 Optimalisering av PCR-betingelser

Startbetingelsene benyttet ved PCR for *POR*5* fungerte optimalt med hensyn på både temperaturbetingelser (Tabell 7A) og reagenskonsentrasjoner (Tabell 7B), og betingelsene ble derfor ikke endret.

Tabell 7. Optimaliserte A. temperaturbetingelser og B. reagenskonsentrasjoner benyttet ved PCR for *POR*5* i sykkelig overvektige pasienter. dNTPmix; blanding av nukleotider, Primer F; forward primer, Primer R; reverse primer.

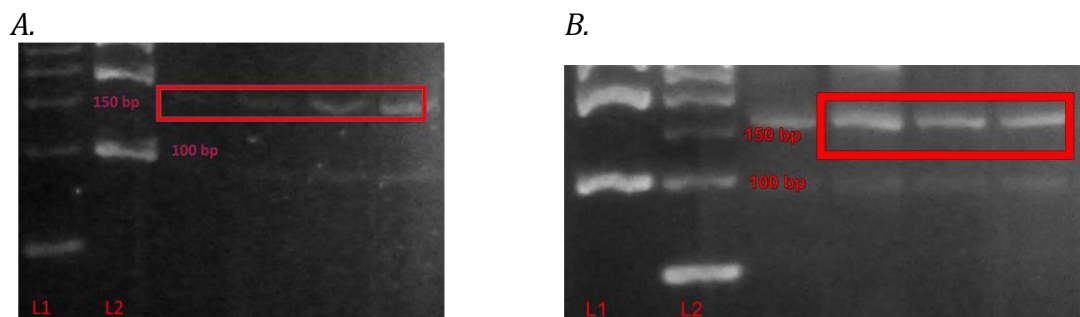
A.

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	65	30 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	Uendelig	1

B.

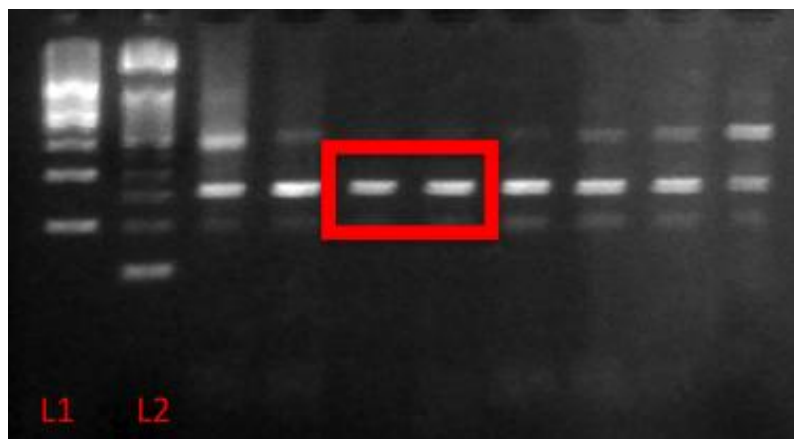
Reagens	Konsentrasjon
PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPmix	0,2 mM
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM
Taq Polymerase	1,25 U
DNA-templat	0,1 µg

Det ble ikke dannet PCR-produkt for *POR*28* når annealingbetingelsene 68°C i 20 s ble benyttet. Endring av annealing-temperatur og varighet av til 65°C i 30 s medførte produktdannelse, men kun for enkelte av pasientene. Svake bånd på gelen indikerte lavt utbytte av ønsket PCR-produkt (Figur 15A). I tillegg ble det dannet et uspesifikt produkt med større fragmentlengde. Ved ytterligere nedsatt annealingtemperatur, samt endring i tid (62°C i 20 s) ble det derimot observert tydelige bånd med riktig fragmentlengde på gelen. Dette indikerer at tilstrekkelig PCR-produkt var dannet (Figur 15B). Disse optimaliserte betingelsene ble derfor benyttet ved genotyping av pasienter i begge populasjonene. Det ble også ved denne annealingtemperatur dannet et biprodukt som kom som en svak front i forkant av *POR*28*-fragmentet. Endelige temperaturbetingelser er angitt i Tabell 8A.



Figur 15. Resultat av PCR A. før og B. etter optimalisering av temperatur og varighet av annealing for *POR*28*. L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

Ved optimalisering av reagenskonsentrasjoner ble det vist et tydelig bånd på gelen som svarte til forventet produktlengde for *POR*28*, samt to uspesifikke bånd som forekom i henholdsvis forkant og etterkant av hovedbåndet (Figur 16). Magnesiumkloridkonsentrasjon på 1 mM og et asymmetrisk konsentrasjonsforhold mellom forward og reverse primer på henholdsvis 0,4 mM og 0,8 mM gav best resultat for reaksjonen (Figur 16, innrammet). Endelige reagenskonsentrasjoner er angitt i Tabell 8B og C. De optimaliserte betingelsene gav et tydelig bånd ved ønsket produktlengde.



Figur 16. Resultat av PCR ved bruk av optimaliserte reagenskonsentrasjoner for *POR*28* (innrammet) sammenlignet med resultatet før optimaliserte konsentrasjoner (henholdsvis til venstre og høyre). L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

Tabell 8 A. Endelige optimaliserte temperaturbetingelser benyttet ved PCR reaksjon for POR*28 i sykkelig overvektige pasienter (n=21) og nyretransplanterte pasienter (n=136).
B. Optimaliserte reagenskonsentrasjoner benyttet ved PCR reaksjon for POR*28 i sykkelig overvektige (n=21) og pasient 1-40 og 60-80 av de nyretransplanterte pasientene.
C. Endelige optimaliserte reagenskonsentrasjoner benyttet for de resterende nyretransplanterte pasientene. dNTPmix; blanding av nukleotider, Primer F; forward primer, Primer R; reverse primer.

A.

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	62	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	uendelig	1

B.

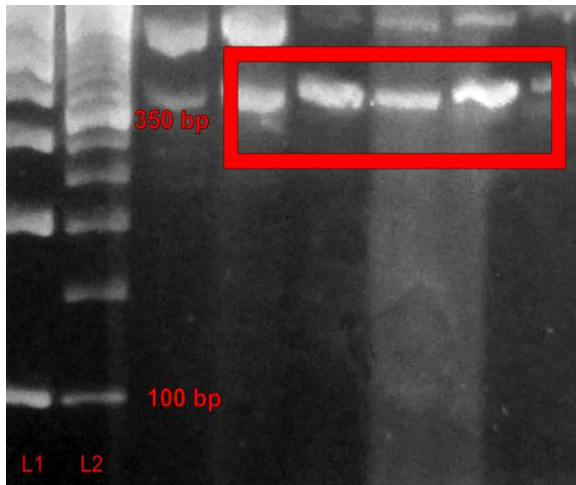
Reagens	Konsentrasjon
PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPmix	0,2 mM
Primer F	0,8 mM
Primer R	0,8 mM
Taq Polymerase	1,25 U
DNA-templat	0,1 µg

C.

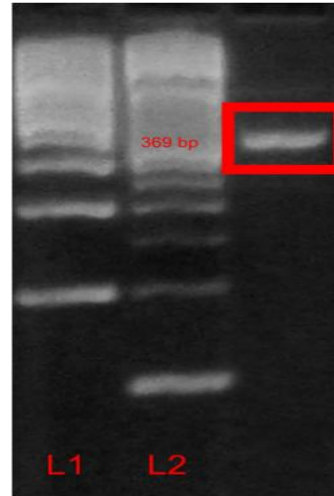
Reagens	Konsentrasjon
PCR buffer	1 x
MgCl ₂	1,0 mM
dNTPmix	0,2 mM
Primer F	0,4 mM
Primer R	0,8 mM
Taq Polymerase	1,25 U
DNA-templat	0,1 µg

For *PPARA(42)* ble det ikke dannet PCR-produkt ved annealingtemperaturene 68°C i 12 s og 70°C i 20 s. Annealingtemperatur 60°C i 20 s gav produkt med ønsket fragmentlengde, men det ble i tillegg dannet et uspesifikt produkt (Figur 17A). Dette uspesifikke produktet ble ikke dannet i like stor grad når annealingtemperatur 62°C i 20 s ble benyttet (Figur 17B). Optimaliserte temperaturbetingelser for *PPARA(42)* er angitt i Tabell 9A.

A.

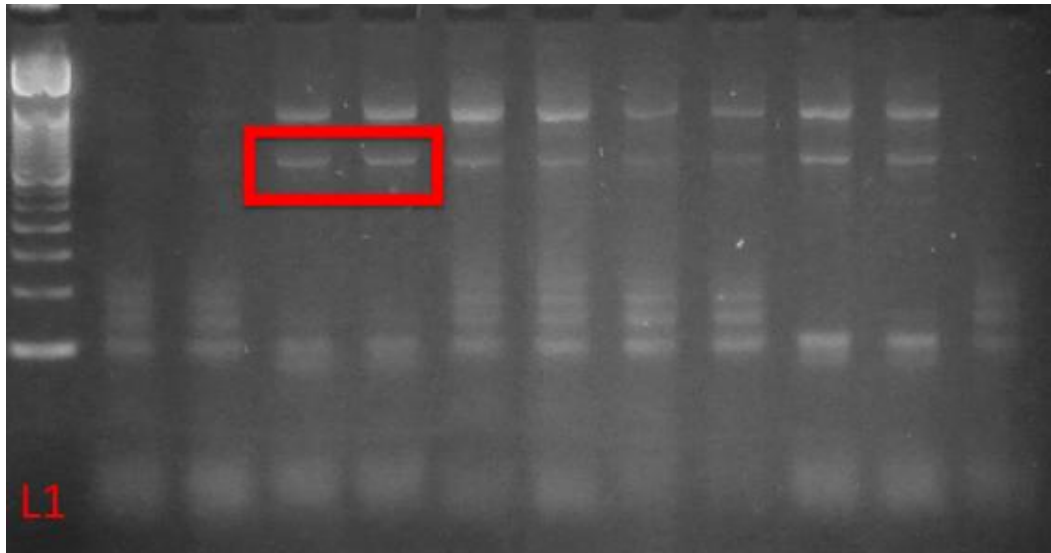


B.



Figur 17. Resultat av PCR A. før og B. etter optimalisering av temperatur og varighet for annealing ved PCR reaksjon for *PPARA(42)*. L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

Flere av reagenskonsentrasjonene som ble testet for *PPARA(42)* medførte ikke dannelse av ønsket PCR-produkt, i tillegg til at en front av små fragmenter lagde støy. De mest optimale betingelsene ble oppnådd med 2 mM magnesiumklorid og et asymmetrisk forhold på henholdsvis 0,8 mM og 0,4 mM av forward og reverse primer. Det ble under disse betingelsene dannet tilstrekkelig PCR-produkt (Figur 18). Gelen viser et tydelig bånd ved 369 bp, og et svakt bånd med økt fragmentlengde som representerer dannelse av et biprodukt. Dette skyldes mest sannsynlig uspesifikk binding av primere. Biproduktet ble imidlertid ikke kuttet av restriksjonsenzymet, og det forstyrret dermed ikke analyseresultatet. Optimaliserte konsentrasjoner av de ulike reagensene er angitt i Tabell 9B.



Figur 18. Resultat av PCR for PPARA(42) ved bruk av optimaliserte reagenskonsentrasjoner (innrammet) sammenlignet med resultater før optimaliserte reagenskonsentrasjoner. L1 representerer en 50 bp DNA-lengdemarkør.

Tabell 9. Optimaliserte A. temperaturbetingelser og B. reagenskonsentrasjoner benyttet ved PCR for PPARA(42) i alle sykelig overvektige- og nyretransplanterte pasienter. dNTPmix; blanding av nukleotider, Primer F; forward primer, Primer R; reverse primer.

A.

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	62	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	Uendelig	1

B.

Reagens	Konsentrasjon
PCR buffer	1 x
MgCl ₂	2 mM
dNTPmix	0,2 mM
Primer F	0,8 mM
Primer R	0,4 mM
Taq Polymerase	1,25 U
DNA-templat	0,1 µg

Betingelsene benyttet ved PCR for PPARA(48) fungerte optimalt fra starten, både med hensyn på temperaturbetingelser (Tabell 10A) og reagenskonsentrasjoner (Tabell 10B), og ble derfor ikke endret.

Tabell 10. PCR-betingelser benyttet ved genotyping av *PPARA(48)* for sykkelig overvektige- og nyretransplanterte pasienter. *dNTPmix*; blanding av nukleotider, *Primer F*; forward primer, *Primer R*; reverse primer.

A.

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	60	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	3 min	1
Hold	4	Uendelig	1

B.

Reagens	Konsentrasjon
PCR buffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPmix	0,2 mM
Primer F	0,8 mM
Primer R	0,8 mM
Taq Polymerase	1,25 U
DNA templat	0,1 µg

Resultatene etter optimalisering av PCR-betingelser for *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)* (Tabell 7-10) ble bekreftet ved gelelektroforese (Figur 15-18) og sekvensering.

4.1.4 Kutting med restriksjonsenzym

Kutting med FastDigest enzymer ble vist å gi like bra resultater som kutting i tre timer med tilsvarende vanlig enzym.

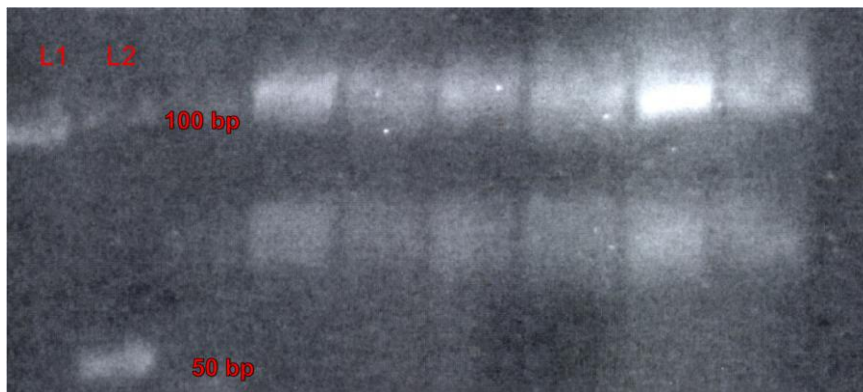
*POR*5*

Restriksjonsenzymet TseI kuttet selektivt ved tilstedeværelse av sekvensen **G/CWGC** i fragmentet (W=A,T,G eller C), i tillegg til at det også kuttet et annet sted i fragmentet. Det vil ikke oppstå kutting to steder i homozygote bærere av *POR*5*, ettersom det har vært et nukleotidskifte fra G>C i første nukleotid i kuttingssetet (vist med uthevet skrift). I henholdsvis homozygote- og heterozygote bærere av villtype allel vil restriksjonsenzymet derimot kutte i henholdsvis begge eller i et allel. Villtype (VT) (G) ble kuttet to steder og resulterte i tre restriksjonsfragmenter med lengde på henholdsvis 94 bp, 61 bp og 12 bp

(Tabell 11, Figur 19). *POR*5* variantallel, som for øvrig ikke ble funnet under genotyping, ville derimot blitt kuttet en gang og generert to fragmenter med lengde på henholdsvis 156 bp og 12 bp. Fragmentet på 12 bp var for lite til å bli detektert på gelen, og analyse av de øvrige fragmentene ble dermed benyttet i genotypingen.

Tabell 11. Resultat fra kutting av *POR*5* med restriksjonsenzymet *TseI*.

VT (Villtype) (G) (bp)	Variantallel, homozygot (C) (bp)	Variantallel, heterozygot (G/C) (bp)
	156	156
94		94
61		61
12	12	12



Figur 19. Gelen viser restriksjonsfragmenter på henholdsvis 94 bp og 64 bp etter kutting av *POR*5*. Fragmentet på 12 bp detekteres ikke på gelen. L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

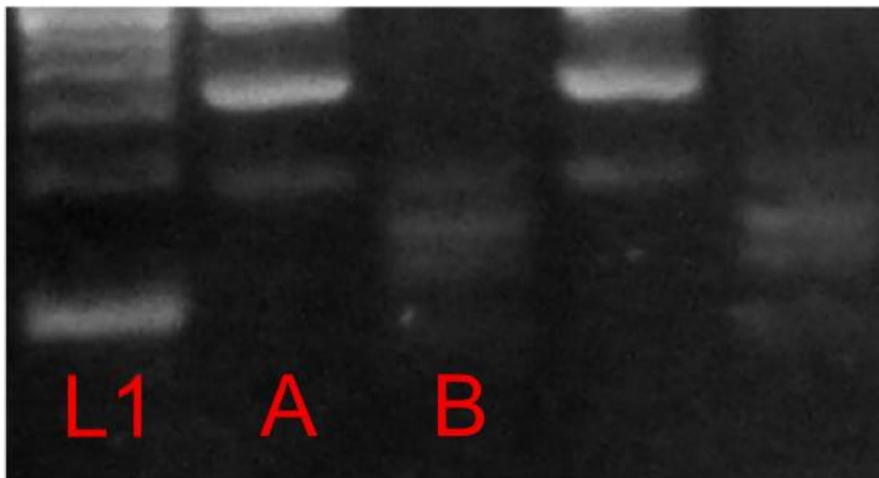
*POR*28*

Restriksjonsenzymet *MspI* kuttet selektivt ved tilstedeværelse av sekvensen C/CGG i fragmentet. Det forekom fullstendig kutting i henholdsvis begge eller et allel i homozygote- og heterozygote bærere av villtypeallelet. I homozygote bærere av *POR*28* variantallelet forekom ikke kutting grunnet C>T nukleotidskifte i kuttingssetet (vist med uthevet skrift). Enzymet kuttet kun et sted i fragmentet og det ble derfor observert to bånd på henholdsvis 90 bp og 68 bp i homozygote bærere av villtypeallelet (Tabell 12, Figur 20). I heterozygote ble det i tillegg observert et bånd på 158 bp ettersom det ene allelet ikke ble kuttet. I homozygote bærere av variantallel ble det kun observert et bånd på 158 bp. Det ble i tillegg observert et svakt bånd på 100 bp som representerer et biprodukt fra PCR-reaksjonen.

Biproduktet ble ikke kuttet av restriksjonsenzymet, og påvirket ikke resultatet av genotypingen.

Tabell 12. Resultat fra kutting av *POR*28* med restriksjonsenzymet *MspI*.

VT (Villtype) (C) (bp)	Variantallel, homozygot (T) (bp)	Variantallel, heterozygot (C/T) (bp)
	158	156
90		90
68		68



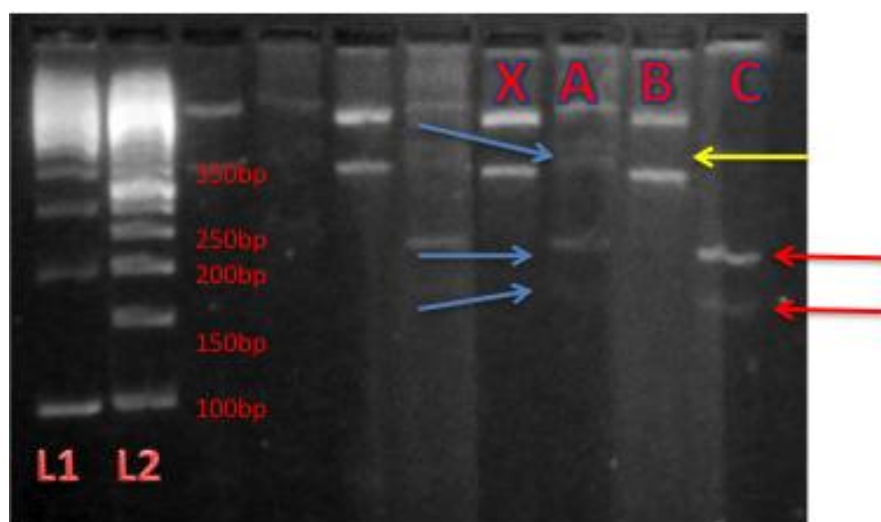
Figur 20. Pasient A og B er eksempler på henholdsvis en homozygot variant og en homozygot villtype for *POR*28*. L1 representerer en 50 bp DNA-lengdemarkør.

PPARA(42)

Restriksjonsenzymet *EcoR1* kuttet selektivt ved nukleotidsekvensen G/AATTC som kun finnes i bærere av *PPARA(42)* variantallelet, grunnet G>A nukleotidskifte (vist med uthevet skrift). Det oppstod ingen kutting i villtypeallelet for *PPARA(42)* ettersom *EcoR1* ikke gjenkjenner sekvensen GAGTTC. Nukleotidsekvensen GAATTC finnes kun et sted i fragmentet, og enzymet kuttet derfor kun en gang. Kuttingen resulterte i to gjenværende restriksjonsfragmenter på 210 bp og 158 bp (et nukleotidpar forsvinner i prosessen) i homozygote bærere av *PPARA(42)* variantallelet. I heterozygote individer ble det i tillegg observert et bånd på 369 bp som representerer det ukuttede fragmentet fra villtypeallelet (Tabell 13, Figur 21).

Tabell 13. Resultat fra kutting av *PPARA*(42) med restriksjonsenzymet *EcoRI*.

VT (Villtype) (G) (bp)	Variantallel, homozygot (A) (bp)	Variantallel, heterozygot (A/G) (bp)
369		369
	210	210
	158	158



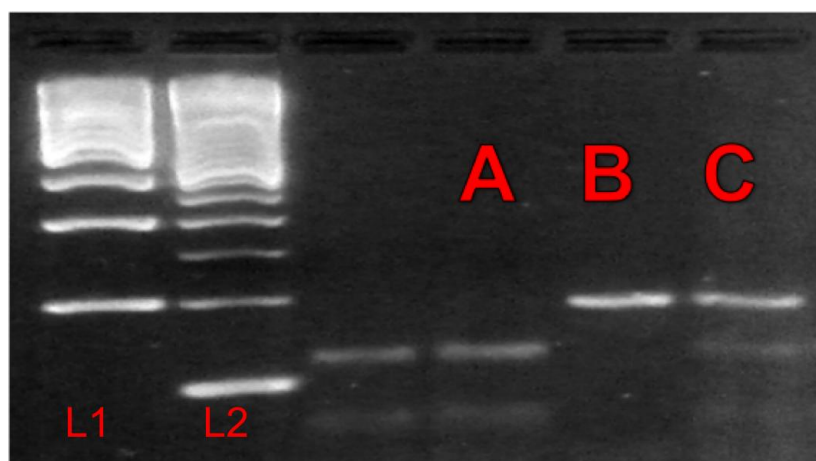
Figur 21. Pasient A og C er eksempler på henholdsvis heterozygot og homozygot bærer av *PPARA*(42) variantallelet. Pasient B er homozygot villtype. De blå pilene viser tre restriksjonsfragmenter på størrelser som samsvarer med en heterozygot genotype, mens de røde pilene viser to gjenstående restriksjonsfragmenter hvilket samsvarer med fullstendig kutting av begge allel, og homozygot variant genotype. Den gule pilen viser et ukuttet fragment på 369 bp. X representerer PCR-produkt før aktivering av restriksjonsenzym. Båndene ovenfor det ønskede produkt er et biprodukt fra PCR, og påvirket ikke RFLP-analysen. L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

PPARA (48)

Restriksjonsenzymet *Tsp509I* kuttet selektivt ved tilstedeværelse av sekvensen /AATT i fragmentet. Det forekom fullstendig kutting i begge eller et allel i henholdsvis homozygote- og heterozygote bærere av villtypeallelet. Nukleotidskifte fra A>G i kuttingssetet (vist med uthevet skrift) medførte at det ikke oppstod kutting i homozygote bærere av *PPARA*(48). Enzymet kuttet kun et sted i fragmentet og det ble observert to bånd på henholdsvis 80 bp og 24 bp i homozygote bærere av villtypeallelet. I heterozygote individer ble det i tillegg observert et bånd på 104 bp som representerer det ukuttete fragmentet (Tabell 14, Figur 22).

Tabell 14. Resultat fra kutting av *PPARA*(48) med restriksjonsenzym *Tsp509I*.

VT (Villtype) (A) (bp)	Variantallel, homozygot (G) (bp)	Variantallel, heterozygot (A/G) (bp)
	104	104
80		80
24		24



Figur 22. Pasient A, B og C er eksempler på henholdsvis homozygot villtype, homozygot variant og heterozygot for *PPARA*(48). L1 og L2 representerer henholdsvis 100 bp og 50 bp DNA-lengdemarkører.

4.1.5 Sekvensering

Resultatet fra sekvensering samsvarte fullstendig med resultat fra RFLP for *PPARA*(42), *PPARA*(48) og *POR**28, og bekreftet riktig genotype. Sekvensering av sekvensene til *POR* og *PPARA*-amplikonene var overens med referanssekvensene fra GenBank. (NG_008930.1. (*POR*), NG_012204 (*PPARA*))

4.2 Genotyping av pasienter

4.2.1 Nyretransplanterte pasienter

Blant de 136 nyretransplanterte pasientene ble det identifisert 68 heterozygote og syv homozygote bærere av *POR**28 variantallelet. Det ble i samme populasjon funnet 51 heterozygote og 12 homozygote bærere av variantallelet *PPARA*(48) (Tabell 15). Allefrekvensene for henholdsvis *POR**28 og *PPARA*(48) var 30- og 28%. Det ble funnet 122 homozygot villtype, og seks heterozygote bærere av *CYP3A4**22. For *CYP3A5**3 ble det

identifisert 29 heterozygote- og én homozygot villtype (CYP3A5*1/*1) (Sara Bremer, RH). Dette resulterte i allelfrekvenser på 2- og 88% for henholdsvis CYP3A4*22 og CYP3A5*3. Det ble ikke funnet noen homozygote CYP3A4*22 varianter.

Tabell 15. Genotype og allelfrekvenser for POR*28, PPARA(42) og PPARA(48), CYP3A5*3 og CYP3A4*22 i nyretransplanterte pasienter.

	VT/VT	VT/VAR	VAR/VAR	Allelfrekvens (%)
<i>POR*28</i>	61	68	7	30
<i>PPARA (42)</i>	81	47	8	23
<i>PPARA (48)</i>	73	51	12	28
<i>CYP3A5*3</i>	1	29	104	88
<i>CYP3A4*22</i>	122	6	0	2

4.2.2 Sykelig overvektige pasienter

Samtlige av de sykelig overvektige pasientene (n=21) var villtype med hensyn på POR*5 mens det var seks homozygote varianter, seks homozygot villtype og ni heterozygote av POR*28, hvilket resulterte i en allelfrekvens på 50% (Tabell 16). Genotyping av PPARA (48) viste fire homozygote varianter, fire heterozygote og 13 homozygot villtype. Allelfrekvensen for PPARA(48) ble følgelig 29% (Tabell 16). For PPARA(42) ble det funnet fem heterozygote varianter mens resten var villtype. Det ble funnet 17 homozygote og fire heterozygote bærere av CYP3A5*3, hvilket resulterte i en allelfrekvens på 90% [181]. Samtlige sykelig overvektige pasienter som hadde ett variantallel av PPARA(42) viste seg også å ha minst ett variantallel av PPARA(48). Tilsvarende observasjon ble også gjort i de nyretransplanterte, med unntak av én pasient som hadde ett variantallel av PPARA(42) uten å være bærer av PPARA(48). Det ble imidlertid funnet pasienter som var bærere av PPARA(48) uten å være bærer av PPARA(42).

Tabell 16. Genotype og allelfrekvens for POR*5, POR*28, PPARA(42) og PPARA(48) og CYP3A5*3 i de sykelig overvektige pasientene.

	VT/VT	VT/VAR	VAR/VAR	Allelfrekvens (%)
<i>POR*5</i>	21	0	0	0
<i>POR*28</i>	6	9	6	50
<i>PPARA(42)</i>	14	5	0	13
<i>PPARA(48)</i>	13	4	4	29
<i>CYP3A5*3</i>	4	17	0	90

4.3 Databearbeidelse og statistiske analyser

4.3.1 Sammenheng mellom *PPARA(42)*, *PPARA(48)*, *POR*28*, *CYP3A5*3* og *CYP3A4*22* genotype og dosejusterte takrolimuskonsentrasjoner i nyretransplanterte pasienter

PPARA(42)

Dosejusterte takrolimuskonsentrasjoner (C/D ratio) var statistisk signifikant høyere (43%) i homozygote bærere av *PPARA(42)* variantallelet sammenlignet med en kombinert gruppe med hetero- og homozygote bærere av villtypeallelet ($P=0,024$) (Figur 23A). Ingen forskjell i C/D ratio ble derimot funnet mellom heterozygote bærere av *PPARA(42)* variantallelet og homozygote villtyper ($P=0,849$) (Figur 24A). Heterozygote- og homozygote bærere av villtypeallelet ble derfor slått sammen til en gruppe i de statistiske analysene. Det ble ikke justert for effekten av *PPARA(42)* i statistiske analyser av de øvrige sekvensvariantene ettersom grupperingen av pasientene for *PPARA(42)* var ulik det som ble gjort for *POR*28*, *PPARA(48)* og *CYP3A5*3*. Av samme grunn ble det heller ikke utført analyser for *PPARA(42)* hvor de andre faktorene var justert for.

PPARA(48)

Det ble vist en tendens til økt C/D ratio i bærere av ett eller to variantalleler av *PPARA(48)* sammenlignet med de som var homozygote bærere av villtypeallelet (Figur 24B). Figur 24B illustrerer at forskjellen mellom heterozygote og homozygote bærere av variantallelet er mindre enn forskjellen mellom heterozygote og homozygote bærere av villtypeallelet. Homo- og heterozygote bærere av variantallelet ble derfor slått sammen til én gruppe i videre statistiske undersøkelser.

Det ble funnet en statistisk signifikant sammenheng mellom *PPARA(48)* genotype og C/D ratio når den isolerte, uavhengige effekten, justert for *POR*28* og *CYP3A5*3*, ble studert ($P=0,012$). Det ble vist et justert estimat på 19% økning i C/D ratio i de som hadde ett eller to *PPARA(48)* variantalleler ($P=0,012$) (Figur 23B). En enkel uavhengig T-test viste ingen statistisk signifikant sammenheng mellom *PPARA(48)* genotype og C/D ratio. C/D ratio ble likevel funnet å være gjennomsnittlig 15% høyere i den kombinerte gruppen av hetero- og homozygote bærere av variantallelet sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet ($P=0,08$).

*POR*28*

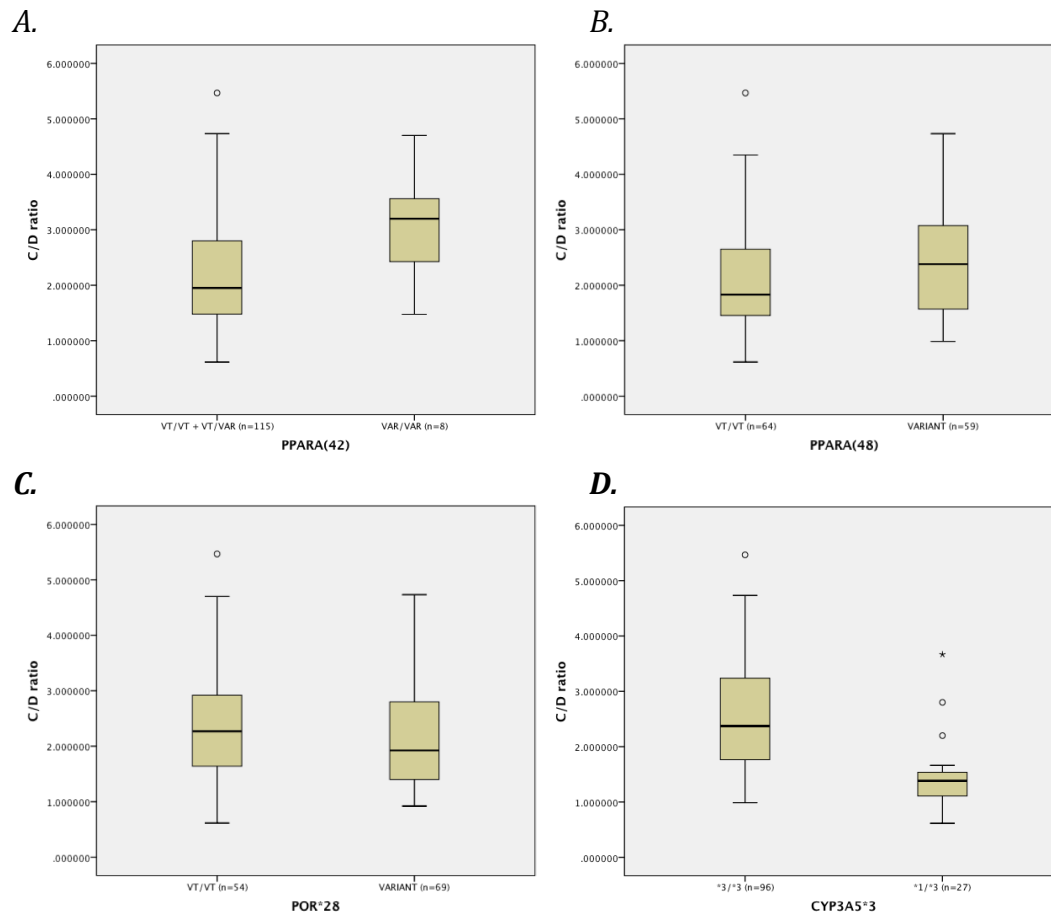
Det var en synkende trend i C/D ratio hos bærere av ett eller to *POR*28* variantteller. C/D ratio var lavere i både hetero- og homozygote bærere av *POR*28* (*POR*1/*28*, *POR*28/*28*) ved sammenligning av medianverdier i de tre gruppene (Figur 24C). Det ble observert mindre spredning i C/D ratio i homozygote bærere av *POR*28* sammenlignet med homozygote villtyper og heterozygote, hvor det var stor spredning. Medianverdi for C/D ratio var 17% lavere i den kombinerte gruppen med *POR*1/*28* og *POR*28/*28* sammenlignet med *POR*1/*1* gruppen, selv om ingen statistisk signifikant sammenheng mellom *POR*28*-genotype og C/D ratio ble vist ($P=0,19$) (Figur 23C). Den uavhengige effekten av *POR*28*, justert for *CYP3A5*3* og *PPARA(48)*, indikerte imidlertid en statistisk signifikant sammenheng mellom *POR*-genotype og C/D ratio for takrolimus ($P=0,039$). Det ble observert en justert effekt på 13% lavere C/D ratio i de som uttrykker minst ett *POR*28* allel sammenlignet med *POR*1/*1* ($P=0,039$). Det ble ikke observert noen statistisk signifikant forskjell mellom den kombinerte gruppen med homo- og heterozygote *POR*28*-bærere og *POR*1/*1* når sammenhengene ble studert isolert i gruppen med pasienter som uttrykker *CYP3A5* ($n=27$) ($P=0,32$). Det ble likevel observert en tendens til nedsatt takrolimuskonsentrasjon hos de med ett eller to *POR*28* allel, sammenlignet med *POR*1/*1* pasienter i pasienter som uttrykker *CYP3A5*.

*CYP3A5*3*

Det ble funnet en statistisk signifikant sammenheng mellom *CYP3A5* genotype og C/D ratio i nyretransplanterte både før og etter at *PPARA(48)* og *POR*28* var justert for (Figur 23D). C/D-ratio var gjennomsnittlig 60% lavere i *CYP3A5*1/*3* heterozygote enn i de som ikke uttrykker *CYP3A5* (*CYP3A5*3/*3*) ($P<0,001$). Justert for effekten av *POR*28* og *PPARA(48)* ble det observert 42% lavere C/D ratio i *CYP3A5*1/*3* bærere sammenlignet med *CYP3A5*3/*3* ($P<0,001$). Det var mindre spredning i *CYP3A5*1/*3* gruppen, sammenlignet med *CYP3A5*3/*3*.

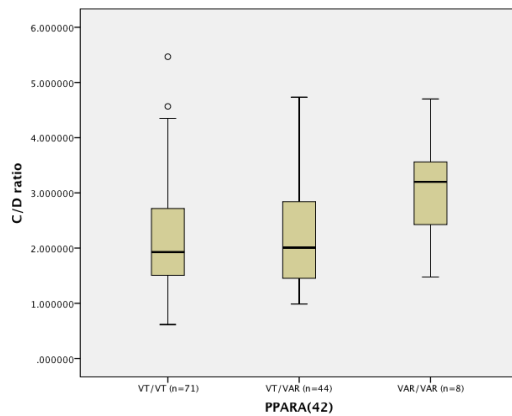
*CYP3A4*22*

Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom *CYP3A4*22* og C/D ratio for takrolimus verken før, eller etter justering for andre variabler.

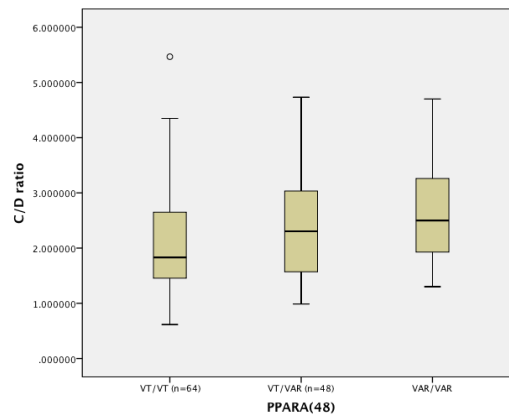


Figur 23. Sammenheng mellom genotype av A. PPARA(42), B. PPARA(48) C. POR*28 D. CYP3A5*3 og C/D ratio av takrolimus i nyretransplanterte pasienter. Boksene er definert av 25% og 75% kvantiler, mens den markerte streken inni boksen representerer median. Linjene ovenfor og nedenfor boksen viser henholdsvis maksimum og minimum verdier. VT/VT; Homozygot for villtypeallelet, VT/VAR; heterozygot for variantallelet, VARIANT; bærere av minst ett variantallel (kombinert gruppe av hetero- og homozygote bærere av variantallel). *3/*3; Homozygot bærer av variantallel for CYP3A5, *1/*3; heterozygot bærer av CYP3A5 villtypeallel.

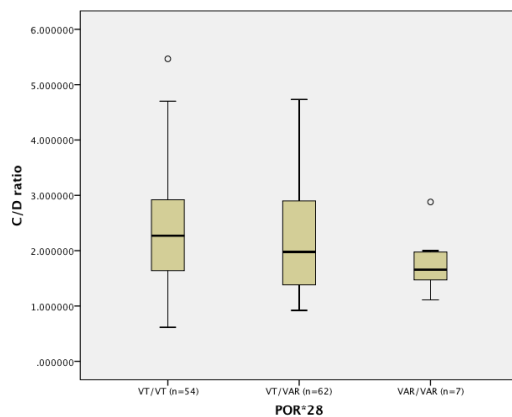
A.



B.



C.



Figur 24. Sammenheng mellom genotype av A. PPARA(42) og B. PPARA(48) C. POR*28 og C/D ratio i nyretransplanterte. Boksene er definert av 25% og 75% kvantiler, mens den markerte streken inni boksen representerer median. Linjene ovenfor og nedenfor boksen viser henholdsvis maksimum og minimum verdier. VT/VT; Homozygote for villtypeallelet, VT/VAR; heterozygote for variantallelet, VAR/VAR; homozygote bærere av variantallelet.

4.3.2 Farmakokinetikk for atorvastatin i sykkelig overvektige

Resultat av farmakokinetiske undersøkelser og beregninger er gjengitt i Tabell 17 [181]. Det ble observert en betydelig interindividuell variabilitet i farmakokinetiske parametere (CL/F , K_{el}) for atorvastatin, og i uttrykk av CYP3A4 i tarm og lever. K_{el} var høyere for atorvastatinlaktonet enn atorvastatinsyren. Det ble observert i underkant av seks ganger høyere nivå av CYP3A4 i tarm enn i lever ved sammenligning av medianverdier.

Tabell 17. Farmakokinetikk for atorvastatin i de 21 sykelig overvektige pasientene [181]. *Cl/F*; oral clearance, K_{el} ; hastighetskonstant for eliminasjon. Tilhørende median med spredningsmål er gjengitt for samtlige parametere. *; manglende tilgjengelige data

Pasient	<i>Cl/F</i>, Atorvastat. syre (L/min)	<i>Cl/F</i>, Atorvastat. lakton (L/min)	K_{el} Atorvastat. syre (t^{-1})	K_{el} Atorvastat. lakton (t^{-1})	<i>CYP3A4</i> i lever pmol/ mg protein	<i>CYP3A4</i> i tarm pmol/ mg protein
2	5,910	13,600	0,044	0,125	4,33	11,31
4	4,09	21,33	0,044	0,045	20,93	15,29
5	4,85	8,60	0,023	0,153	*	*
6	4,140	58,240	0,070	0,105	1,67	11,90
7	24,75	35,96	0,117	0,128	7,93	12,07
8	3,36	5,04	0,120	0,115	12,40	33,47
9	10,81	11,94	0,047	0,086	14,85	14,73
12	4,50	5,06	0,036	0,046	*	1,35
13	3,55	5,64	0,075	0,072	0,5	5,55
14	14,860	15,460	0,076	0,060	0,27	2,06
15	9,25	9,89	0,058	0,055	0,43	1,52
16	5,650	8,570	0,051	0,163	0,64	2,90
17	4,65	8,05	0,047	0,081	*	0,8
18	7,18	13,28	0,166	0,121	0,34	2,92
19	10,450	20,440	0,052	0,032	0,47	7,73
20	10,08	25,23	0,181	0,131	0,27	1,21
21	20,38	38,62	0,080	0,111	17,17	30,64
23	3,770	6,640	0,087	0,077	0,64	1,18
24	4,82	5,01	0,211	0,104	0,52	1,67
25	3,49	18,42	0,090	0,121	8,98	35,52
26	10,66	33,46	0,044	0,067	11,45	46,83
Median	5,7 (3,4- 24,8)	13,3 (5,0- 58,2)	0,04 (0,02- 0,21)	0,10 (0,03- 0,16)	1,16 (0,27- 17,17)	6,66 (0,8- 46,83)

4.3.3 Sammenheng mellom *PPARA*(42), *PPARA*(48), *POR**28 og *CYP3A5**3 genotype og farmakokinetiske variabler i sykelig overvektige pasienter.

PPARA(42)

CL/F for atorvastatinlaktonet var 40% lavere i gruppen med hetero- og homozygote bærere av *PPARA*(42) sammenlignet med homozygote villtyper (P=0,139) (Tabell 18A, Figur 25A). Tilsvarende effekt på atorvastatinsyren ble ikke observert (P=1,0) (Tabell 18B). Det var ingen sammenheng mellom *PPARA*(42) genotype og K_{el} for atorvastatin (Tabell 18A og B).

PPARA(48)

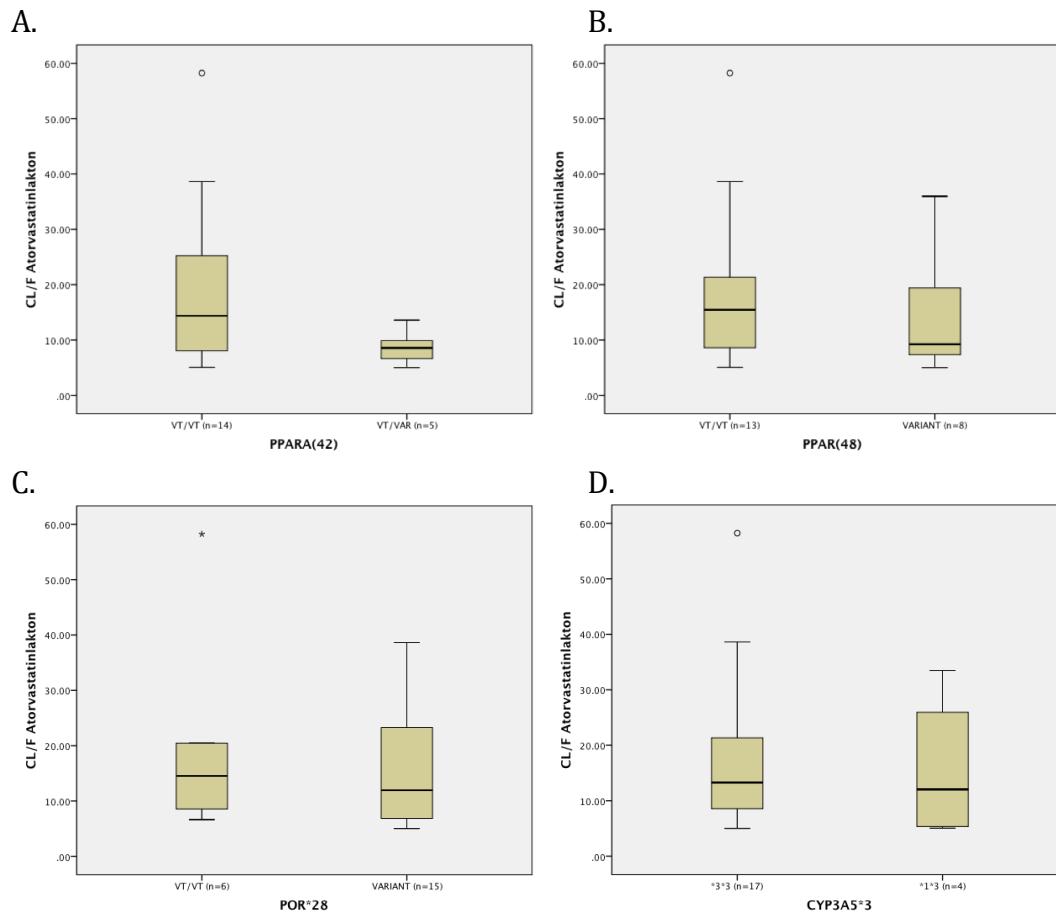
Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell for CL/F i pasienter med minst ett variantallel i forhold til pasienter med villtype av *PPARA(48)*. Medianverdien av CL/F for atorvastatinlaktonet var likevel 40% lavere i gruppen med hetero- og homozygote bærere av variantallelet sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet (P=0,39) (Tabell 18A, Figur 25B). Tilsvarende effekt på atorvastatinsyren ble ikke observert (Tabell 18B). Ingen sammenheng ble funnet mellom *PPARA(48)* genotype og K_{el} for atorvastatin (Tabell 18A og B).

*POR*28*

Det ble observert en svak nedgang i medianverdi av CL/F for atorvastatinlaktonet (18%, P=0,59) (Tabell 18A, Figur 25C) for *POR*1/*28* og *POR*28/*28* sammenlignet med *POR*1/*1*. Effekten var imidlertid ikke statistisk signifikant, og det ble observert stor spredning i gruppen med variantallel. Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom *POR*28* genotype og K_{el} for atorvastatin (Tabell 18A og B).

*CYP3A5*3*

Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant sammenheng mellom *CYP3A5*3* og farmakokinetiske variabler for atorvastatin i sykkelig overvektige (Tabell 18A og B, Figur 25D).



Figur 25. Sammenheng mellom genotype av A. PPARA(42) B. PPARA(48) C. POR*28 D. CYP3A5*3 og CL/F for atorvastatinlaktonet. Boksene er definert av 25% og 75% kvantiler, mens den markerte streken inni boksen representerer median. Linjene ovenfor og nedenfor boksen viser henholdsvis maksimum og minimum verdier. VT/VT; Homozygot for villtypeallelet, VT/VAR; heterozygot for variantallelet, VARIANT; bærere av minst ett variantallel (kombinert gruppe av hetero- og homozygote bærere av variantallel). For CYP3A5: *3/*3; Homozygot bærer av variantallel for CYP3A5, *1/*3; heterozygot bærer av CYP3A5 villtypeallel.

Tabell 18. Median og konfidensintervall for CL/F og K_{el} verdier for A. atorvastatinsyre og B. atorvastatinlaktone for homozygote villtyper (VT) og bærere av minst et variantallel (Var) av henholdsvis *POR*28*, *PPARA(48)*, *PPARA(42)* og *CYP3A5*3*. Tilhørende P-verdier henviser til resultat fra Mann-Whitney U-test.

A.

	Atorvastatinlaktone					
	CL/F (L/min)			K_{el} (h ⁻¹)		
	Median VT	Median Var	P-verdi	Median VT	Median Var	P-verdi
PPARA(42)	14,37 (5,04-58,24)	8,57 (5,01-13,60)	0,139	0,095 (0,05-0,15)	0,104 (0,06-0,16)	0,643
PPARA(48)	15,46 (5,04-58,24)	9,23 (5,01-35,96)	0,39	0,09 (0,03-0,15)	0,12 (0,06-0,16)	0,17
POR*28	14,53 (6,64-58,24)	11,94 (5,01-38,62)	0,59	0,09 (0,03-0,16)	0,10 (0,05-0,15)	0,88
CYP3A5*3	13,28 (5,01-58,24)	12,03 (5,04-33,46)	0,59	0,10 (0,03-0,16)	0,09 (0,07-0,12)	0,89

B.

	Atorvastatinsyre					
	CL/F (L/min)			K_{el} (h ⁻¹)		
	Median VT	Median Var	P-verdi	Median VT	Median Var	P-verdi
PPARA(42)	4,74 (3,36-20,38)	5,65 (3,77-9,25)	1,0	0,07 (0,02-0,18)	0,06 (0,04-0,21)	0,71
PPARA(48)	4,85 (3,36-20,38)	5,76 (3,77-24,75)	0,66	0,07 (0,02-0,17)	0,073 (0,04-0,21)	0,33
POR*28	5,78 (3,77-14,86)	4,85 (3,36-24,75)	0,88	0,06 (0,04-0,09)	0,070 (0,02-0,21)	0,64
CYP3A5*3	5,91 (3,77-24,75)	3,52 (3,36-10,66)	0,06	0,06 (0,02-0,21)	0,08 (0,04-0,12)	0,59

4.3.4 Sammenheng mellom *PPARA(42)*, *PPARA(48)*, *POR*28* og *CYP3A5*3* genotype og proteinuttrykk av *CYP3A4* i lever og tarm i sykkelig overvektige pasienter

PPARA(42)

Det var en tendens til lavere uttrykk av *CYP3A4* i både lever (Figur 26A) og tarm (Figur 26B) i bærere av et *PPARA(42)* allel sammenlignet med homozygote bærere av villtype allelet. Det ble funnet 85- og 75% lavere uttrykk av *CYP3A4* i gruppen med heterozygote bærere av *PPARA(42)* i henholdsvis lever (P=0,395) og tarm (P=0,127) sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet.

PPARA(48)

I bærere av *PPARA(48)* ble det også funnet en tendens til lavere uttrykk av CYP3A4 i lever (Figur 26C). Det ble observert 93% lavere CYP3A4 uttrykk i bærere av minst ett variantallel sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet ($P=0,2$).

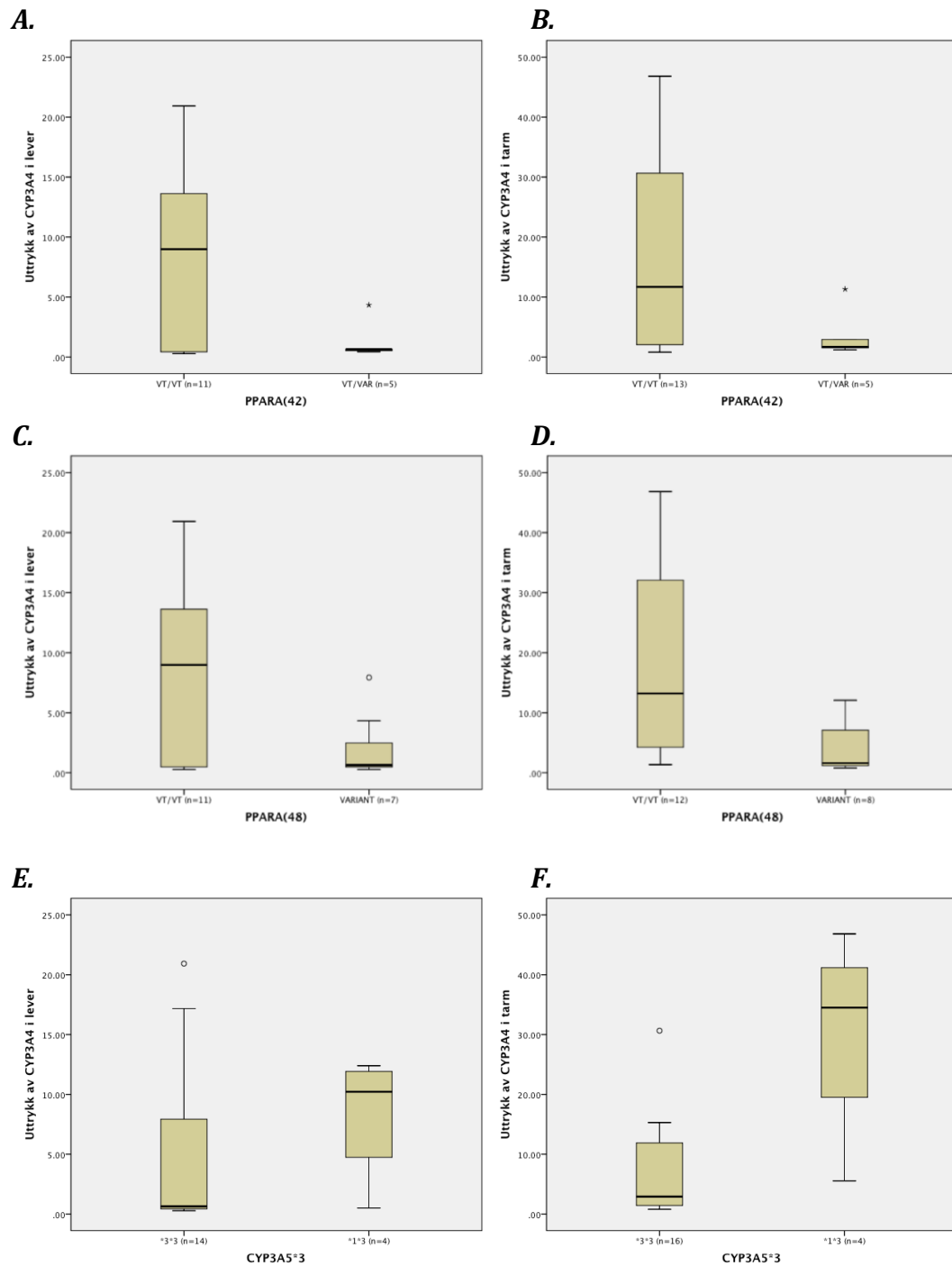
Det var en statistisk signifikant effekt av *PPARA(48)* på uttrykk av CYP3A4 i tarm ($P=0,01$). Uttrykket av CYP3A4 var ved sammenligning av median i de to gruppene 88% lavere i gruppen med hetero- og homozygote bærere av variantallelet for *PPARA(48)* sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet (Figur 26D). Det ble imidlertid ikke observert noen statistisk signifikant forskjell mellom hetero- og homozygote bærere av *PPARA(48)* variantallelet.

*POR*28*

Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom *POR*28* genotype og uttrykk av CYP3A4, verken i lever eller i tarm.

*CYP3A5*3*

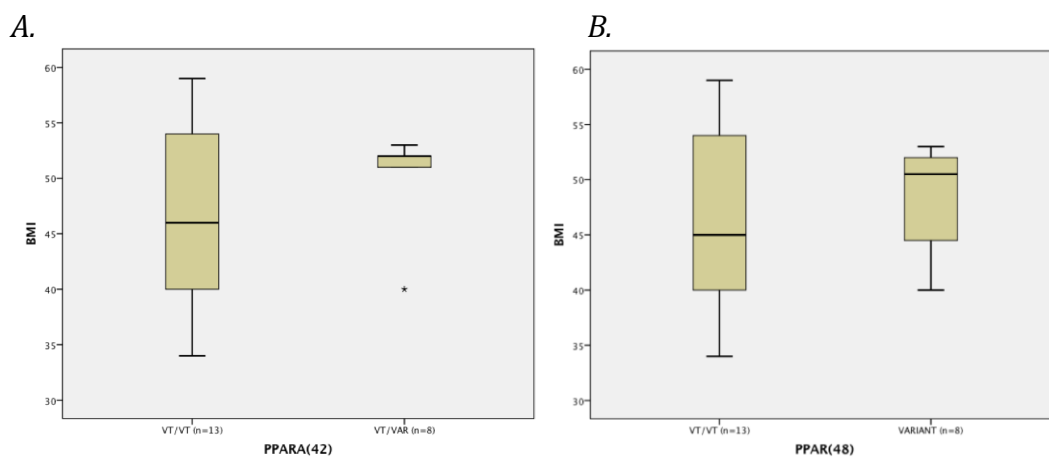
Uttrykket av CYP3A4 var 12 ganger høyere i tarm hos heterozygote bærere av *CYP3A5*1* sammenlignet med homozygote *CYP3A5 *3/*3* pasienter ($P=0,018$) (Figur 26F). En tendens til lignende påvirkning ble også vist for uttrykk av CYP3A4 i lever ($P=0,29$) (Figur 26E).



Figur 26A og B. Sammenheng mellom genotype av PPARA(42) og uttrykk av CYP3A4 i henholdsvis lever og tarm. **C og D.** Sammenheng mellom genotype av PPARA(48) og uttrykk av CYP3A4 i henholdsvis lever og tarm. **E og F.** Sammenheng mellom genotype av CYP3A5*3 og uttrykk av CYP3A4 i henholdsvis lever og tarm. Boksene er definert av 25% og 75% kvantiler, mens den markerte streken inni boksen representerer median. Linjene ovenfor og nedenfor boksen viser henholdsvis maksimum og minimum verdier. VT/VT; Homozygote for villtypeallelet, VT/VAR; heterozygote for variantallelet, VARIANT; bærere av minst ett variantallel (kombinert gruppe av hetero- og homozygote bærere av variantallel). For CYP3A5: *3/*3; Homozygot bærer av variantallel for CYP3A5, *1/*3; heterozygot bærer av CYP3A5 villtypeallel.

4.3.5 Sammenheng mellom *PPARA*(42), *PPARA*(48) og *POR**28 og BMI i sykelig overvektige pasienter

BMI tenderte til å være gjennomsnittlig høyere i bærere av minst ett allel av *PPARA*(42) og *PPARA*(48) sammenlignet med homozygot villtype (Figur 27A og B). Sammenhengen var imidlertid ikke statistisk signifikant for verken *PPARA*(42) ($P=0,40$) eller *PPARA*(48) ($P=0,47$). Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom *POR**28 genotype og BMI.



Figur 27. Sammenheng mellom genotype av A. *PPARA*(42) og B. *PPARA*(48) og BMI i sykelig overvektige. Boksene er definert av 25% og 75% kvantiler, mens den markerte streken inni boksen representerer median. Linjene ovenfor og nedenfor boksen viser henholdsvis maksimum og minimum verdier. VT/VT; Homozygote for villtypeallelet, VT/VAR; heterozygote for variantallelet, VARIANT; bærere av minst ett variantallel (kombinert gruppe av hetero- og homozygote bærere av variantallel).

5 Diskusjon

Metodeutvikling

Det er i denne oppgaven utviklet metoder til genotyping av *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*. *POR*28* viste best utbytte ved annealingtemperatur 62°C i 20 s. Forekomsten av uspesifikke produkter var lav ved disse betingelsene, og de påvirket ikke genotypingen. For *PPARA(42)* ble det ved valgte annealingbetingelser også dannet en viss mengde uspesifikt produkt. Disse uspesifikke produktene forekom imidlertid sporadisk, hvilket kan skyldes ujevn temperaturregulering i PCR-blokken. Heller ikke for *PPARA(42)* påvirket det uspesifikke produktet genotypingen. Betingelsene benyttet ved annealing for de fire sekvensvariantene, er innenfor normalområdet for annealingbetingelser (50-65°C i 20-40 s). Optimalt resultat ble oppnådd med bruk av relativt lave magnesiumkonsentrasjoner (1-2 mM), i tråd med at det tidligere er vist at lave magnesiumkonsentrasjoner gir optimal aktivitet av taq polymerase [178]. Analyse av pasientprøver var i samsvar med resultat fra sekvensering, og bekreftet at metodene er egnet for genotyping.

Farmakokinetisk betydning av PPARA(42) og PPARA(48)

Det ble funnet en allelfrekvens på 28% for *PPARA(48)* i de nyretransplanterte pasientene, tilsvarende allelfrekvensen i de sykkelig overvektige pasientene (29%). Allelfrekvensen for *PPARA(42)* i de nyretransplanterte pasientene var høyere (23%) enn både den som ble funnet i de sykkelig overvektige pasientene (13%), og det som tidligere er rapportert i friske frivillige personer (12%) [130]. Fordelingen av *PPARA(42)*- og *PPARA(48)* genotype i de sykkelig overvektige var ikke i Hardy-Weinberg likevekt. Det ble i denne populasjonen identifisert like mange homozygote og heterozygote bærere av *PPARA(48)*, mens det for *PPARA(42)* ikke ble funnet noen homozygote bærere av variantallelet.

C/D ratio for takrolimus var statistisk signifikant høyere i bærere av *PPARA(42)* (uten justeringer for andre variabler) og *PPARA(48)* (justert for effekten av *POR*28* og *CYP3A5*3*) variantallel sammenlignet med bærere av villtypeallel. En høyere C/D ratio ble vist for både homo- og heterozygote bærere av *PPARA(48)*, mens tilsvarende effekt av *PPARA(42)* kun ble funnet i homozygote bærere av variantallelet. Det ble ikke observert noen forskjell mellom heterozygote bærere av *PPARA(42)* variantallel og homozygote villtyper. En slik sammenheng mellom *PPARA(42)/(48)* og C/D ratio for takrolimus er ikke

rapportert tidligere. Høyere C/D ratio i bærere av *PPARA(42)* og/eller *PPARA(48)* kan skyldes en nedgang i CYP3A4-mediert metabolisme som tidligere er vist for disse sekvensvariantene med hensyn på atorvastatin [130]. Takrolimus bindes utstrakt til lipoproteiner i plasma. En økning i lipider vil dermed kunne gi lavere fri fraksjon av legemidlet i plasma, og ettersom takrolimus er et lavekstraherbart legemiddel, medfører dette nedsatt total clearance, og dernest en høyere plasmakonsentrasjon. Det kan dermed ikke utelukkes at en endring i lipider, forårsaket av nedsatt eller dysfunksjonell PPAR α , kan være medvirkende til en høyere C/D ratio i bærere av disse sekvensvariantene [183, 184].

Det ble funnet en 40% lavere CL/F for atorvastatinlaktonet i bærere av minst et variantallel for både *PPARA(42)* og *PPARA(48)* sammenlignet med homozygot villtype i de sykkelig overvektige pasientene (P=0,139, P=0,39). Tilsvarende har Klein et al. rapportert nedsatt CYP3A4-mediert metabolisme av atorvastatin i friske frivillige personer, men da kun i homozygote bærere av de to variantallelene [130]. Det ble ikke funnet noen effekt av disse variantallelene på CL/F for atorvastatinsyren. Det har i samme populasjon tidligere vært observert en sammenheng mellom uttrykk av CYP3A4 i tarm og farmakokinetikk for atorvastatinlakton, men ikke for atorvastatinsyre [181], noe som kan forklares ved at atorvastatinlaktonet har høyere affinitet for CYP3A4 enn atorvastatinsyren. Ingen sammenheng ble observert mellom K_{el} for atorvastatin og genotype av *PPARA(42)* og *PPARA(48)*, hvilket indikerer at presystemisk clearance påvirkes i større grad enn systemisk clearance. Det kan imidlertid ikke utelukkes at korresponderende effekt av *PPARA(42)/(48)* på clearance og distribusjonsvolum (V_d) kan være årsak til den tilsynelatende manglende effekten på K_{el} [181]. Manglende statistisk signifikans med hensyn til den observerte nedgangen i CL/F kan skyldes at andre variabler kan ha motvirket effekten av *PPARA(42)* og *PPARA(48)* på CYP3A4 aktivitet. Ulike kombinasjoner av sekvensvarianter i en studiepopulasjon vil generelt komplisere tolkningen av effektene for de ulike sekvensvariantene. Det er viktig å studere effekten av de ulike sekvensvariantene hver for seg for å kunne si noe om hvilken av dem som har størst betydning.

Det var en tendens til lavere uttrykk av CYP3A4 i lever hos bærere av minst ett *PPARA(48)* allel sammenlignet med homozygot villtype for dette allelet i sykkelig overvektige pasienter. Tilsvarende negativ effekt på hepatisk CYP3A4-uttrykk ble også funnet hos heterozygote bærere av *PPARA(42)*. Funnene er i samsvar med resultater fra en tidligere studie hvor det,

både *in vitro* og *in vivo*, ble funnet nedsatt uttrykk av CYP3A4 i lever, men da kun i homozygote bærere av disse sekvensvariantene [130]. Uttrykk av CYP3A4 i tarm var statistisk signifikant lavere (88%) i den kombinerte gruppen med hetero- og homozygote bærere av *PPARA(48)* sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet. Likeledes ble det funnet 75% lavere CYP3A4-uttrykk i tarm hos bærere av ett *PPARA(42)* variantallel sammenlignet med villtype ($P=0,127$). Det er ikke tidligere vist noen sammenheng mellom verken *PPARA(42)* eller *PPARA(48)* og uttrykk av CYP3A4 i tarm, men funnene er i tråd med den observerte tendensen til lavere CYP3A4-uttrykk i lever i samme populasjon. Den relativt store spredningen i data som ble observert i gruppen med homozygot villtyper, skyldes mest sannsynlig den naturlige interindividuelle variasjonen i uttrykk av CYP3A4. Lav aktivitet av CYP3A4 (i lever og tarm) vil kunne gi nedsatt presystemisk metabolisme, og dermed føre til økt biotilgjengelighet av legemidler som metaboliseres av CYP3A4. Atorvastatinlaktonet metaboliseres i hovedsak av CYP3A4, og disse funnene kan dermed bidra til å forklare den negative effekten på CL/F som ble vist for både *PPARA(42)* og *PPARA(48)* [164].

Resultatene viste at det å kun ha ett *PPARA(42)* eller *PPARA(48)* allel var tilstrekkelig til å gi lavere uttrykk av CYP3A4. Klein et al. fant derimot ingen forskjell i uttrykk av CYP3A4 i lever mellom heterozygote bærere av henholdsvis *PPARA(42)* og *PPARA(48)* og homozygote bærere av villtypeallelet for de to sekvensvariantene i friske frivillige personer [130]. Denne forskjellen kan skyldes lavt antall pasienter i vår studie sammenlignet med tidligere studier, samt at genotypene er studert i ulike populasjoner.

En tidligere studie viste opp til fire ganger økt uttrykk av CYP3A4 ved aktivering av $PPAR\alpha$, hvilket indikerer at $PPAR\alpha$ er involvert i transkripsjonell regulering av CYP3A4 [59]. Samtidig er det nylig vist at *PPARA(42)* og *PPARA(48)* er assosiert med nedsatt uttrykk av $PPAR\alpha$ [130], hvilket kan forklare den negative påvirkningen av hepatisk CYP3A4-uttrykk som ble observert i bærere av disse sekvensvariantene. Flere foreslåtte mekanismer kan forklare våre funn, blant annet den strukturelle likheten mellom $PPAR\alpha$ og kjernereseptorene PXR og CAR, som tidligere er vist å påvirke CYP3A4 uttrykk. Det er også foreslått at $PPAR\alpha$ indirekte kan aktivere CYP3A4 via PXR [130-133]. CYP3A4 nedreguleres ved inflammasjon, og det er derfor postulert at den antiinflammatoriske effekten av $PPAR\alpha$ kan ha en positiv effekt på uttrykk av CYP3A4 [135]. Samtlige bærere av ett *PPARA(42)*

variantallel blant de sykelig overvektige pasientene var også bærere av ett eller to *PPARA(48)* variantallel. Dette ble også vist for samtlige pasienter, med unntak av én, i de nyretransplanterte pasientene. Dette svarer til hva vi ville forvente basert på at disse SNPene er sammenkoblede [130], og at de synes å påvirke CYP3A4- uttrykk og aktivitet i samme grad og retning.

PPAR α er tidligere vist å ha gunstig effekt på lipidmetabolisme [135], og det kan dermed spekuleres i hvorvidt nedsatt uttrykk av PPAR α kan være assosiert med ugunstig lipidprofil og muligens ha en sammenheng med fedme i bærere av ett eller to *PPARA(42)/(48)* allel. Aktivisering av PPAR α via fibrater (PPAR α -agonist) har tidligere vært postulert å muligens ha en gunstig effekt ved fedme [135]. Hetero- og homozygote bærere av *PPARA(42)* og *PPARA(48)* hadde høyere BMI sammenlignet med homozygot villtype (P=0,40, P=0,47). En negativ korrelasjon mellom BMI og uttrykk av CYP3A4 samt CL/F av atorvastatinlaktonet har tidligere vært vist i disse pasientene [181]. Det har vært postulert at fedme kan redusere aktiviteten av CYP3A4 [185], og nedsatt clearance av CYP3A4-substratet MDZ har vært observert i overvektige pasienter [186]. Effekten av BMI kan dermed være en kofaktor med hensyn til observasjonen av nedsatt CYP3A4-uttrykk i bærere av ett eller to *PPARA(42)*- og *PPARA(48)* allel. At allelfrekvensen var like høy i de nyretransplanterte pasientene, som sammenlignet med de sykelig overvektige kan anses som normalvektige, taler mot hypotesen om at *PPARA(42)/(48)* er assosiert med fedme. Det lave pasientantallet i populasjonen, samt manglende normalfordeling av data, medførte at forutsetningene for uni- og multivariate statistiske tester ikke var overholdt. Det ble derfor benyttet en ikke-parametrisk test, da disse er mer robuste ved analyse av skjeve fordelinger. Det var imidlertid ikke mulig å justere for andre faktorer ved bruk av denne testen, og vi kan dermed ikke utelukke at andre variabler er medvirkende til den observerte sammenhengen mellom *PPARA(42)/(48)* og CYP3A4-uttrykk.

Lavt uttrykk av CYP3A4 vil kunne gi økt biotilgjengelighet og nedsatt clearance av mange legemidler inkludert statiner, og øke risiko for toksisitet av disse legemidlene. Atorvastatinlaktonet påvirker ikke HMG-CoA-reduktasen, og gir følgelig ingen lipidsenkning. Likevel er forhøyet plasmanivå av denne metabolitten assosiert med økt risiko for muskelbivirkninger [187]. Det kan derfor ikke utelukkes at genotyping av *PPARA* vil kunne være klinisk relevant ved dosering av atorvastatin. Dysfunksjonelle varianter av

PPAR α vil i teorien kunne påvirke uttrykk av proteiner som reguleres av denne transkripsjonsfaktoren, og genetisk polymorfisme i *PPARA* kan muligens være en farmakogenetisk predikator for CYP3A4-aktivitet. Dette vil da kunne bidra til bedre å forutsi farmakokinetikk og legemiddelrespons av mange klinisk brukte legemidler. I tillegg kan genotyping av *PPARA* være interessant i forbindelse med dyslipidemi og inflammasjon [130]. Det kreves imidlertid flere studier i større og flere ulike populasjoner, og det er per i dag for tidlig å trekke konklusjoner om den kliniske betydningen av å genotype pasienter for *PPARA(42)* og *PPARA(48)*.

*Farmakokinetisk betydning av POR*28*

POR er nylig vist å kunne bidra til å forklare noe av den store interindividuelle variasjon som observeres i CYP3A-aktivitet. Det ble for *POR*28* funnet en allelfrekvens på 30% i de nyretransplanterte pasientene hvilket samsvarer med tidligere rapporterte allelfrekvenser i kaukasiske populasjoner [28, 34, 89, 120]. Allelfrekvensen for *POR*28* i de sykelig overvektige pasientene var 50%. Dette er betydelig høyere enn det som stort sett er observert i normalvektige pasienter tidligere [89], og også høyere enn allelfrekvensen i de nyretransplanterte pasientene i denne studien. I tillegg var fordelingen av genotypene i de sykelig overvektige pasientene ikke i henhold til Hardy-Weinberg-likevekten. Den høye allelfrekvensen kan være et tilfeldig funn på grunn av få pasienter i denne populasjonen. Det er imidlertid nylig vist en økt allelfrekvens for sekvensvarianten *SLCO1B1* c.521C i opptakstransportøren organisk anion-transporterende polypeptid 1B1 (OATP1B1) i disse pasientene [181]. Det kan altså ikke utelukkes at den betydelig høyere allelfrekvensen i sykelig overvektige pasienter kan skyldes karakteristika hos denne pasientgruppen, men dette må imidlertid studeres videre.

Det ble funnet en statistisk signifikant lavere C/D-ratio i den kombinerte gruppen med hetero- og homozygote *POR*28* bærere sammenlignet med homozygote *POR*1* bærere uavhengig av CYP3A5 genotype. Tilsvarende effekt av *POR*28* har tidligere vært vist for konsentrasjon av takrolimus, men da kun i pasienter som uttrykker CYP3A5 [89, 120, 122]. Vi fant derimot ingen statistisk signifikant effekt når betydningen av *POR*28* ble studert kun i pasienter som uttrykker CYP3A5, hvilket kan indikere at det også er en sammenheng mellom *POR*28* og CYP3A4. Det må forøvrig tas i betraktning at det var et lavt antall pasienter (n=27) i gruppen som uttrykker CYP3A5. Det kan heller ikke utelukkes at CYP-induserende legemidler, som

for eksempel steroider, kan ha påvirket resultatet ettersom CYP3A5, i mindre grad enn CYP3A4, påvirkes av legemiddelinteraksjoner [91]. Sekvensvarianten *POR*28* er vist å kunne påvirke metabolisme av flere ulike legemidler [89, 120]. Uansett støtter resultatene i denne studien at genotyping av *POR*28* kan bidra til å forklare noe av den store interindividuelle variasjonen i takrolimuskonsentrasjoner.

For atorvastatinlaktonet ble det funnet en lavere CL/F (18%, $P=0,59$) i bærere av minst ett *POR*28*-allel sammenlignet med homozygote *POR*1/*1* bærere i sykelig overvektige pasienter ved sammenligning av medianverdier i de to gruppene. Dette kan tyde på at *POR*28*-bærere har nedsatt metabolisme av atorvastatin, i motsetning til en mulig økt metabolisme av takrolimus i pasienter med dette variantallelet. Den tilsynelatende ulike effekten av *POR*28* i forhold til metabolisme av takrolimus og atorvastatin er i tråd med tidligere funn som indikerer at effekten av *POR*28* er substratspesifikk [89, 120]. Dette kan skyldes at substratinduserte konformasjonsendringer i CYP-enzymene kan påvirke interaksjonen mellom CYP-enzymene og POR i ulik grad [34, 89, 101, 117, 120]. Det må påpekes at en stor spredning i gruppen med variantallel gjør at man ikke kan utelukke at den observerte forskjellen er et tilfeldig funn. Resultatet er imidlertid i samsvar med tidligere studier hvor nedsatt metabolisme av ulike CYP3A substrater har vært vist [120, 125]. Både *in vitro* og *in vivo* studier har vist nedsatt metabolisme av MDZ i bærere av *POR*28* allel i forhold til villtype [120, 125]. MDZ er substrat for både CYP3A4 og CYP3A5, og metabolisme av dette substratet reflekterer dermed total CYP3A aktivitet. Elens et al viste en 45% nedsatt MDZ-metabolisme *in vivo*, men kun i de som uttrykker CYP3A5. De Jonge et al viste som tidligere nevnt motsatt effekt av *POR*28* for takrolimuskonsentrasjoner, men i likhet med Elens et al. ble denne effekten også kun observert i de som uttrykker CYP3A5 [89, 120]. Det ble imidlertid ikke funnet noen sammenheng mellom *POR*28* og metabolisme av erytromycin som er et rent CYP3A4 substrat. Dette støtter hypotesen om at CYP3A5 i større grad enn CYP3A4 påvirkes av *POR*28* [120]. I motsetning til Elens et al observerte Oneda et al 1,6 ganger høyere metabolisme av MDZ *in vivo* i en studie hvor det ikke ble stratifisert med hensyn på CYP3A5 genotype. Det må imidlertid påpekes at pasientene i den studien samtidig brukte andre CYP3A substrater som kan ha modifisert aktiviteten [188]. Effekten av *POR*28* i forbindelse med atorvastatinmetabolisme er ikke studert tidligere, og det lave antallet pasienter, samt manglende statistisk signifikans gjør at det foreløpig er for tidlig å trekke konklusjoner om betydningen av *POR*28* for metabolisme av atorvastatin.

En annen sekvensvariant, *POR*5* er tidligere vist å ha kraftig påvirkning på CYP3A metabolisme [125, 128], og ble derfor ansett som en interessant mutasjon å genotype for. Det ble imidlertid ikke funnet noen variantallel av *POR*5* i de sykelig overvektige samtidig som tidligere studier indikerte at denne mutasjonen i høy grad er assosiert med meget alvorlig sykdom [102, 105]. *POR*5* er derfor av liten klinisk relevans i befolkningen forøvrig, og det ble derfor besluttet å ikke teste for denne mutasjonen i de nyretransplanterte pasientene

*Farmakokinetisk betydning av CYP3A5*3 og CYP3A4*22*

Det ble funnet en klar sammenheng mellom CYP3A5 genotype og dosejusterte takrolimuskonsentrasjoner, både før og etter at andre variabler var justert for. En gjennomsnittlig 60% lavere takrolimuskonsentrasjon ble vist i pasienter som uttrykker CYP3A5 sammenlignet med *CYP3A5*3* bærere ($P < 0,001$). Disse resultatene bekrefter betydningen av CYP3A5-genotype som en viktig farmakogenetisk predikator for dosering av takrolimus [97-99]. Det ble ikke funnet noen effekt av *CYP3A4*22* på takrolimuskonsentrasjoner. Dette er i kontrast til tidligere funn hvor *CYP3A4*22* har vært assosiert med nedsatt uttrykk og aktivitet av CYP3A4 og nedsatt metabolisme av takrolimus [87, 88]. Ulike kombinasjoner av genotype for *CYP3A4*22* og *CYP3A5*3* er nylig postulert å kunne gi ulik CYP3A-fenotype med hensyn på metabolisme, hvor en person som ikke uttrykker CYP3A5 samtidig som man er bærer av *CYP3A4*22* har blitt postulert å kunne klassifiseres som en "poor metabolizer" av CYP3A [189]. Manglende effekt av *CYP3A4*22* i denne oppgaven kan skyldes det lave antallet pasienter med denne sekvensvarianten i populasjonen, og dette bør dermed studeres videre i større populasjoner.

I de sykelig overvektige pasientene ble det funnet en sammenheng mellom CYP3A5 genotype og uttrykk av CYP3A4 i lever og tarm. Det var 12 ganger høyere uttrykk av CYP3A4 i både tarm ($P = 0,018$) og lever ($P = 0,29$) i *CYP3A5*1/*3* heterozygote pasientene. Disse resultatene er i tråd med hypotesen om felles regulering av CYP3A4- og CYP3A5 uttrykk [190], og kan indikere at uttrykk av CYP3A5 korrelerer med økt uttrykk av CYP3A4. Tilsvarende har Lin et al. vist en sterk sammenheng ($r = 0,93$) mellom uttrykk av CYP3A5 og CYP3A4 i lever hos pasienter som har minst ett *CYP3A5*1* allel [190]. Det kan derfor spekuleres i om økt uttrykk av CYP3A4 er medvirkende til den observerte økningen i CYP3A-metabolisme som er observert i de som uttrykker CYP3A5.

6 Konklusjon

Det har blitt utviklet metoder til genotyping av *POR*5*, *POR*28*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*. Metodenes spesifisitet ble bekreftet ved sekvensering.

Det ble funnet tilsvarende allelfrekvens for *PPARA(48)* i begge populasjonene på henholdsvis 28- og 29%, mens det for *POR*28* var en betydelig høyere (50%) allelfrekvens i de sykelig overvektige- enn i de nyretransplanterte pasientene (30%).

C/D ratio for takrolimus var statistisk signifikant lavere (60%) i bærere av *CYP3A5*1* sammenlignet med homozygote bærere av *CYP3A5*3* i de nyretransplanterte pasientene. I tillegg til effekten av *CYP3A5*3* ble *PPARA(42)* og *PPARA(48)* vist å være av betydning for takrolimuskonsentrasjon. En statistisk signifikant økning i C/D-ratio for takrolimus ble vist for *PPARA(42)* uten at andre variabler var justert for, og for *PPARA(48)* etter at effekten av *POR*28*- og *CYP3A5*3* var justert for. C/D ratio for takrolimus var derimot statistisk signifikant lavere i hetero- og homozygote bærere av *POR*28* sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallelet i de nyretransplanterte pasientene.

CL/F av atorvastatinlaktonet var lavere i bærere av *PPARA(42)* og/eller *PPARA(48)* sammenlignet med homozygot villtype. Det ble samtidig funnet en sammenheng mellom *PPARA(42)/(48)*- genotype og uttrykk av CYP3A4 i lever og tarm i de sykelig overvektige pasientene. CYP3A4-uttrykket i tarm var 88% lavere i bærere av minst ett *PPARA(48)* allel sammenlignet med homozygote bærere av villtypeallel.

Ytterligere studier må til for å studere hvorvidt genotyping av disse sekvensvariantene kan bidra til optimalisering av individualisert legemiddelterapi.

Litteraturliste

1. Gonzales, F.J. and R.H. Tukey, *Drug metabolism, in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed 2006: McGraw-Hill Companies Inc.
2. Guengerich, F.P., *Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues?* Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 159-97.
3. Guengerich, F.P., *Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity*. AAPS J, 2006. **8**(1): p. E101-11.
4. Nelson, D.R., et al., *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(1): p. 1-42.
5. Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova, *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(5-6): p. 737-47.
6. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 414-23.
7. Venkatakrisnan, K., L.L. Von Moltke, and D.J. Greenblatt, *Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models*. J Clin Pharmacol, 2001. **41**(11): p. 1149-79.
8. Guengerich, F.P., *Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 1-17.
9. Omura, T., *Forty years of cytochrome P450*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(3): p. 690-8.
10. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response*. N Engl J Med, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
11. Paine, M.F., et al., *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(5): p. 880-6.
12. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 535-67.
13. Lee, S.S., et al., *Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3012-22.
14. Westlind, A., et al., *Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(5): p. 1349-55.
15. Komori, M., et al., *Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers*. Biochemistry, 1990. **29**(18): p. 4430-3.
16. Schuetz, J.D., D.L. Beach, and P.S. Guzelian, *Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver*. Pharmacogenetics, 1994. **4**(1): p. 11-20.
17. Koch, I., et al., *Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(10): p. 1108-14.
18. Huang, W., et al., *Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1434-45.
19. Kamdem, L.K., et al., *Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus*. Clin Chem, 2005. **51**(8): p. 1374-81.

20. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 383-91.
21. Williams, J.A., et al., *Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(8): p. 883-91.
22. Schacter, B.A., et al., *Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system*. J Biol Chem, 1972. **247**(11): p. 3601-7.
23. Ono, T. and K. Bloch, *Solubilization and partial characterization of rat liver squalene epoxidase*. J Biol Chem, 1975. **250**(4): p. 1571-9.
24. Nishino, H. and T. Ishibashi, *Evidence for requirement of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the microsomal NADPH-sterol Delta7-reductase system*. Arch Biochem Biophys, 2000. **374**(2): p. 293-8.
25. Enoch, H.G. and P. Strittmatter, *Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase*. J Biol Chem, 1979. **254**(18): p. 8976-81.
26. Vermilion, J.L., et al., *Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase*. J Biol Chem, 1981. **256**(1): p. 266-77.
27. Miller, W.L., *Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2544-50.
28. Hart, S.N. and X.B. Zhong, *P450 oxidoreductase: genetic polymorphisms and implications for drug metabolism and toxicity*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 439-52.
29. Lu, A.Y., K.W. Junk, and M.J. Coon, *Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components*. J Biol Chem, 1969. **244**(13): p. 3714-21.
30. Venkatakrisnan, K., et al., *Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(12): p. 1493-504.
31. Schlichting, I., et al., *The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1615-22.
32. Wang, M., et al., *Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8411-6.
33. Gutierrez, A., et al., *Stopped-flow kinetic studies of flavin reduction in human cytochrome P450 reductase and its component domains*. Biochemistry, 2001. **40**(7): p. 1964-75.
34. Huang, N., et al., *Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1733-8.
35. Shephard, E.A., et al., *Isolation of a human cytochrome P-450 reductase cDNA clone and localization of the corresponding gene to chromosome 7q11.2*. Ann Hum Genet, 1989. **53**(Pt 4): p. 291-301.
36. Otto, D.M., et al., *Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6103-16.

37. Shen, A.L., K.A. O'Leary, and C.B. Kasper, *Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6536-41.
38. Gu, J., et al., *Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene: impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25895-901.
39. Henderson, C.J., et al., *Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13480-6.
40. Remmel, R.P. and B. Burchell, *Validation and use of cloned, expressed human drug-metabolizing enzymes in heterologous cells for analysis of drug metabolism and drug-drug interactions*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(4): p. 559-66.
41. Schenkman, J.B. and I. Jansson, *The many roles of cytochrome b5*. Pharmacol Ther, 2003. **97**(2): p. 139-52.
42. Bakken, G.V., et al., *Metabolism of quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in presence or absence of cytochrome B5*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(2): p. 254-8.
43. Yamaori, S., et al., *Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(12): p. 2333-40.
44. Lee, S.J. and J.A. Goldstein, *Comparison of CYP3A4 and CYP3A5: the effects of cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 reductase on testosterone hydroxylation activities*. Drug Metab Pharmacokinet, 2012. **27**(6): p. 663-7.
45. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
46. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
47. Bookout, A.L., et al., *Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network*. Cell, 2006. **126**(4): p. 789-99.
48. Braissant, O., et al., *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat*. Endocrinology, 1996. **137**(1): p. 354-66.
49. Issemann, I. and S. Green, *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*. Nature, 1990. **347**(6294): p. 645-50.
50. Michalik, L., et al., *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 726-41.
51. Bays, H. and E.A. Stein, *Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents*. Expert Opin Pharmacother, 2003. **4**(11): p. 1901-38.
52. Chakravarthy, M.V., et al., *Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver*. Cell, 2009. **138**(3): p. 476-88.
53. Reddy, J.K., D.L. Azarnoff, and C.E. Hignite, *Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens*. Nature, 1980. **283**(5745): p. 397-8.
54. Lefebvre, P., et al., *Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 571-80.
55. DiRenzo, J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers*

- with ligands, coactivators, and corepressors. Mol Cell Biol, 1997. 17(4): p. 2166-76.*
56. Kliewer, S.A., et al., *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. Nature, 1992. 358(6389): p. 771-4.*
 57. Dowell, P., et al., *Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. J Biol Chem, 1999. 274(22): p. 15901-7.*
 58. Yu, S. and J.K. Reddy, *Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. Biochim Biophys Acta, 2007. 1771(8): p. 936-51.*
 59. Thomas, M., et al., *Direct Transcriptional Regulation of Human Hepatic Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha). Mol Pharmacol, 2013.*
 60. Klein, K. and U.M. Zanger, *Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. Front Genet, 2013. 4: p. 12.*
 61. Eichelbaum, M., M. Ingelman-Sundberg, and W.E. Evans, *Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annu Rev Med, 2006. 57: p. 119-37.*
 62. Evans, W.E. and M.V. Relling, *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science, 1999. 286(5439): p. 487-91.*
 63. Ozdemir, V., et al., *Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. Pharmacogenetics, 2000. 10(5): p. 373-88.*
 64. Vesell, E.S., *Advances in pharmacogenetics and pharmacogenomics. J Clin Pharmacol, 2000. 40(9): p. 930-8.*
 65. Wolf, C.R., et al., *CYP2D6 genotyping and the association with lung cancer susceptibility. Pharmacogenetics, 1994. 4(2): p. 104-6.*
 66. Zhou, S.F., J.P. Liu, and B. Chowbay, *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. Drug Metab Rev, 2009. 41(2): p. 89-295.*
 67. Rettie, A.E., et al., *Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. Pharmacogenetics, 1994. 4(1): p. 39-42.*
 68. Steward, D.J., et al., *Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. Pharmacogenetics, 1997. 7(5): p. 361-7.*
 69. Goldstein, J.A., *Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. Br J Clin Pharmacol, 2001. 52(4): p. 349-55.*
 70. Chou, W.H., et al., *Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. J Clin Psychopharmacol, 2000. 20(2): p. 246-51.*
 71. McGraw, J. and D. Waller, *Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. 8(3): p. 371-82.*
 72. Giacomini, K.M., *Pharmacogenetics in Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed2006: McGraw-Hill Companies Inc.*
 73. Chang, K.C., et al., *Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. Lancet, 1978. 1(8074): p. 1132-3.*
 74. Christensen, H. and M. Hermann, *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. Front Pharmacol, 2012. 3: p. 8.*
 75. Kraemer, M.J., et al., *Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak. Pediatrics, 1982. 69(4): p. 476-80.*
 76. Renton, K.W., *Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. 1(4): p. 629-40.*

77. Ingelman-Sundberg, M., et al., *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects*. Pharmacol Ther, 2007. **116**(3): p. 496-526.
78. Bailey, D.G., et al., *Grapefruit juice-drug interactions*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **46**(2): p. 101-10.
79. Gomez, D.Y., et al., *The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine*. Clin Pharmacol Ther, 1995. **58**(1): p. 15-9.
80. Greenblatt, D.J., et al., *Inhibition of triazolam clearance by macrolide antimicrobial agents: in vitro correlates and dynamic consequences*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(3): p. 278-85.
81. Bolley, R., et al., *Tacrolimus-induced nephrotoxicity unmasked by induction of the CYP3A4 system with St John's wort*. Transplantation, 2002. **73**(6): p. 1009.
82. Yee, G.C., et al., *Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration*. Lancet, 1995. **345**(8955): p. 955-6.
83. Kang, Y.S., et al., *The CYP3A4*18 genotype in the cytochrome P450 3A4 gene, a rapid metabolizer of sex steroids, is associated with low bone mineral density*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(3): p. 312-8.
84. Lamba, J.K., et al., *Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(10): p. 1271-94.
85. Sim, S.C. *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database*. 2012; Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/por.htm>.
86. Westlind-Johnsson, A., et al., *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(6): p. 755-61.
87. Wang, D., et al., *Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs*. Pharmacogenomics J, 2011. **11**(4): p. 274-86.
88. Elens, L., et al., *A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients*. Clin Chem, 2011. **57**(11): p. 1574-83.
89. de Jonge, H., et al., *The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients*. Pharmacogenomics, 2011. **12**(9): p. 1281-91.
90. Thervet, E., et al., *Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(6): p. 721-6.
91. Patki, K.C., L.L. Von Moltke, and D.J. Greenblatt, *In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(7): p. 938-44.
92. Ferrareso, M., et al., *Influence of the CYP3A5 genotype on tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in young kidney transplant recipients*. Pediatr Transplant, 2007. **11**(3): p. 296-300.
93. Goto, M., et al., *CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(7): p. 471-8.
94. Hesselink, D.A., et al., *Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **74**(3): p. 245-54.
95. Kivisto, K.T., et al., *Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(8): p. 523-5.

96. Zheng, H., et al., *Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms*. Am J Transplant, 2003. **3**(4): p. 477-83.
97. Jacobson, P.A., et al., *Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium*. Transplantation, 2011. **91**(3): p. 300-8.
98. Kuypers, D.R., et al., *CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(6): p. 711-25.
99. Macphee, I.A., et al., *Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement*. Transplantation, 2002. **74**(11): p. 1486-9.
100. Miller, W.L., et al., *Consequences of POR mutations and polymorphisms*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **336**(1-2): p. 174-9.
101. Agrawal, V., N. Huang, and W.L. Miller, *Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(7): p. 569-76.
102. Fluck, C.E., C. Nicolo, and A.V. Pandey, *Clinical, structural and functional implications of mutations and polymorphisms in human NADPH P450 oxidoreductase*. Fundam Clin Pharmacol, 2007. **21**(4): p. 399-410.
103. Arlt, W., *P450 oxidoreductase deficiency and Antley-Bixler syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **8**(4): p. 301-7.
104. Fluck, C.E. and W.L. Miller, *P450 oxidoreductase deficiency: a new form of congenital adrenal hyperplasia*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(4): p. 435-41.
105. Huang, N., et al., *Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 729-49.
106. Krone, N., et al., *Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(2): p. 162-72.
107. Adachi, M., et al., *A male patient presenting with major clinical symptoms of glucocorticoid deficiency and skeletal dysplasia, showing a steroid pattern compatible with 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency, but without obvious CYP17 gene mutations*. Endocr J, 1999. **46**(2): p. 285-92.
108. Reardon, W., et al., *Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? J Med Genet, 2000. 37(1): p. 26-32.*
109. Miller, W.L., *Congenital adrenal hyperplasia*. N Engl J Med, 1986. **314**(20): p. 1321-2.
110. Fluck, C.E., et al., *Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 228-30.
111. Arlt, W., et al., *Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study*. Lancet, 2004. **363**(9427): p. 2128-35.
112. Fukami, M., et al., *Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 414-26.
113. Wu, L., et al., *Transgenic mice with a hypomorphic NADPH-cytochrome P450 reductase gene: effects on development, reproduction, and microsomal cytochrome P450*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(1): p. 35-43.

114. Hart, S.N., et al., *Novel SNPs in cytochrome P450 oxidoreductase*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. **22**(4): p. 322-6.
115. Emoto, C., N. Murayama, and H. Yamazaki, *Effects of enzyme sources on midazolam 1'-hydroxylation activity catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 in combination with NADPH-cytochrome P450 reductase*. Drug Metab Lett, 2008. **2**(3): p. 190-2.
116. Christensen, H., et al., *CYP3A5-mediated metabolism of midazolam in recombinant systems is highly sensitive to NADPH-cytochrome P450 reductase activity*. Xenobiotica, 2011. **41**(1): p. 1-5.
117. Dhir, V., et al., *Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(8): p. 1958-68.
118. Han, J.F., et al., *Effect of genetic variation on human cytochrome p450 reductase-mediated paraquat cytotoxicity*. Toxicol Sci, 2006. **91**(1): p. 42-8.
119. Gomes, L.G., et al., *The common P450 oxidoreductase variant A503V is not a modifier gene for 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(7): p. 2913-6.
120. Elens, L., et al., *Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin*. Pharmacogenet Genomics, 2013.
121. Hart, S.N., et al., *Genetic polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(1): p. 11-24.
122. Zhang, J.J., et al., *Effect of the P450 oxidoreductase *28 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese healthy male volunteers*. Eur J Clin Pharmacol, 2012.
123. Sandee, D., et al., *Effects of genetic variants of human P450 oxidoreductase on catalysis by CYP2D6 in vitro*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(11): p. 677-86.
124. Subramanian, M., et al., *Effect of P450 oxidoreductase variants on the metabolism of model substrates mediated by CYP2C9.1, CYP2C9.2, and CYP2C9.3*. Pharmacogenet Genomics, 2012. **22**(8): p. 590-7.
125. Agrawal, V., et al., *Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(10): p. 611-8.
126. Yang, G., et al., *Effects of the CYP oxidoreductase Ala503Val polymorphism on CYP3A activity in vivo: a randomized, open-label, crossover study in healthy Chinese men*. Clin Ther, 2011. **33**(12): p. 2060-70.
127. Adachi, M., et al., *POR R457H is a global founder mutation causing Antley-Bixler syndrome with autosomal recessive trait*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(6): p. 633-5.
128. Chen, X., et al., *Influence of various polymorphic variants of cytochrome P450 oxidoreductase (POR) on drug metabolic activity of CYP3A4 and CYP2B6*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38495.
129. Tomalik-Scharte, D., et al., *Impaired hepatic drug and steroid metabolism in congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency*. Eur J Endocrinol, 2010. **163**(6): p. 919-24.
130. Klein, K., et al., *PPARA: a novel genetic determinant of CYP3A4 in vitro and in vivo*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **91**(6): p. 1044-52.

131. Burk, O., et al., *The induction of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the human liver and intestine is mediated by the xenobiotic sensors pregnane X receptor (PXR) and constitutively activated receptor (CAR)*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38379-85.
132. Jover, R., M. Moya, and M.J. Gomez-Lechon, *Transcriptional regulation of cytochrome p450 genes by the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4-alpha*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(5): p. 508-19.
133. Aouabdi, S., G. Gibson, and N. Plant, *Transcriptional regulation of the PXR gene: identification and characterization of a functional peroxisome proliferator-activated receptor alpha binding site within the proximal promoter of PXR*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(1): p. 138-44.
134. Aitken, A.E. and E.T. Morgan, *Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(9): p. 1687-93.
135. Pyper, S.R., et al., *PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer*. Nucl Recept Signal, 2010. **8**: p. e002.
136. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
137. Rath, T., *Tacrolimus in transplant rejection*. Expert Opin Pharmacother, 2013. **14**(1): p. 115-22.
138. Abou-Jaoude, M.M., et al., *Tacrolimus (FK506) versus cyclosporine microemulsion (neoral) as maintenance immunosuppression therapy in kidney transplant recipients*. Transplant Proc, 2005. **37**(7): p. 3025-8.
139. Friemann, S., et al., *Improvement of nephrotoxicity, hypertension, and lipid metabolism after conversion of kidney transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus*. Transplant Proc, 1998. **30**(4): p. 1240-2.
140. Kuypers, D.R. and Y. Vanrenterghem, *Time to reach tacrolimus maximum blood concentration, mean residence time, and acute renal allograft rejection: an open-label, prospective, pharmacokinetic study in adult recipients*. Clin Ther, 2004. **26**(11): p. 1834-44.
141. Venkataramanan, R., et al., *Clinical pharmacokinetics of tacrolimus*. Clin Pharmacokinet, 1995. **29**(6): p. 404-30.
142. Vincent, S.H., et al., *In vitro metabolism of FK-506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as the major enzymes responsible for its metabolism*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(2): p. 454-60.
143. Venkataramanan, R., et al., *Pharmacokinetics of FK 506 in transplant patients*. Transplant Proc, 1991. **23**(6): p. 2736-40.
144. Lampen, A., et al., *Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability*. Drug Metab Dispos, 1995. **23**(12): p. 1315-24.
145. Moller, A., et al., *The disposition of 14C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects*. Drug Metab Dispos, 1999. **27**(6): p. 633-6.
146. Dai, Y., et al., *Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(5): p. 836-47.
147. Roy, J.N., et al., *Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(9): p. 659-65.

148. Lennernas, H., *Clinical pharmacokinetics of atorvastatin*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(13): p. 1141-60.
149. Williams, D. and J. Feely, *Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors*. Clin Pharmacokinet, 2002. **41**(5): p. 343-70.
150. Koren, M.J. and D.B. Hunninghake, *Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the alliance study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(9): p. 1772-9.
151. LaRosa, J.C., et al., *Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(14): p. 1425-35.
152. Pedersen, T.R., et al., *High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial*. JAMA, 2005. **294**(19): p. 2437-45.
153. Schwartz, G.G., et al., *Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial*. JAMA, 2001. **285**(13): p. 1711-8.
154. Colhoun, H.M., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 685-96.
155. Sever, P.S., et al., *Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2003. **361**(9364): p. 1149-58.
156. Insull, W., et al., *Comparison of efficacy and safety of atorvastatin (10mg) with simvastatin (10mg) at six weeks*. ASSET Investigators. Am J Cardiol, 2001. **87**(5): p. 554-9.
157. Karalis, D.G., et al., *Comparison of efficacy and safety of atorvastatin and simvastatin in patients with dyslipidemia with and without coronary heart disease*. Am J Cardiol, 2002. **89**(6): p. 667-71.
158. Wassmann, S., et al., *Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(2): p. 300-5.
159. Macin, S.M., et al., *Atorvastatin has an important acute anti-inflammatory effect in patients with acute coronary syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Am Heart J, 2005. **149**(3): p. 451-7.
160. Christians, U., W. Jacobsen, and L.C. Floren, *Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar?* Pharmacol Ther, 1998. **80**(1): p. 1-34.
161. Igel, M., T. Sudhop, and K. von Bergmann, *Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins)*. Eur J Clin Pharmacol, 2001. **57**(5): p. 357-64.
162. Riedmaier, S., et al., *UDP-glucuronosyltransferase (UGT) polymorphisms affect atorvastatin lactonization in vitro and in vivo*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(1): p. 65-73.
163. Wilke, R.A., J.H. Moore, and J.K. Burmester, *Relative impact of CYP3A genotype and concomitant medication on the severity of atorvastatin-induced muscle damage*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(6): p. 415-21.
164. Kantola, T., K.T. Kivisto, and P.J. Neuvonen, *Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(1): p. 58-65.

165. Prueksaritanont, T., et al., *beta-Oxidation of simvastatin in mouse liver preparations*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(10): p. 1251-5.
166. Prueksaritanont, T., et al., *Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(5): p. 505-12.
167. Jacobsen, W., et al., *Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(11): p. 1369-78.
168. Neuvonen, P.J. and K.M. Jalava, *Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **60**(1): p. 54-61.
169. Neuvonen, P.J., T. Kantola, and K.T. Kivisto, *Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **63**(3): p. 332-41.
170. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
171. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
172. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
173. Lynch, J.R. and J.M. Brown, *The polymerase chain reaction: current and future clinical applications*. J Med Genet, 1990. **27**(1): p. 2-7.
174. Rettinger, S.D., D.G. Hafenrichter, and M.W. Flye, *Clinical diagnostic applications of the polymerase chain reaction. Infection and rejection*. Arch Surg, 1993. **128**(11): p. 1253-9.
175. Kramer, M.F. and D.M. Coen, *Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 20.
176. Old, R.W. and S.B. Primrose, *The polymerase chain reaction*, in *Principles of Gene Manipulation* 5th ed 1994, Blackwell Science Ltd.
177. Lawyer, F.C., et al., *High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity*. PCR Methods Appl, 1993. **2**(4): p. 275-87.
178. Eckert, K.A. and T.A. Kunkel, *DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction*. PCR Methods Appl, 1991. **1**(1): p. 17-24.
179. Rychlik, W., W.J. Spencer, and R.E. Rhoads, *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6409-12.
180. Skottheim, I.B., et al., *Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(6): p. 699-705.
181. Ulvestad, M., et al., *Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 expression in liver and intestine on interpatient pharmacokinetic variability of atorvastatin in obese subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **93**(3): p. 275-82.
182. BioLabs. *NEBcutter V2.0*. 2013; Available from: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.

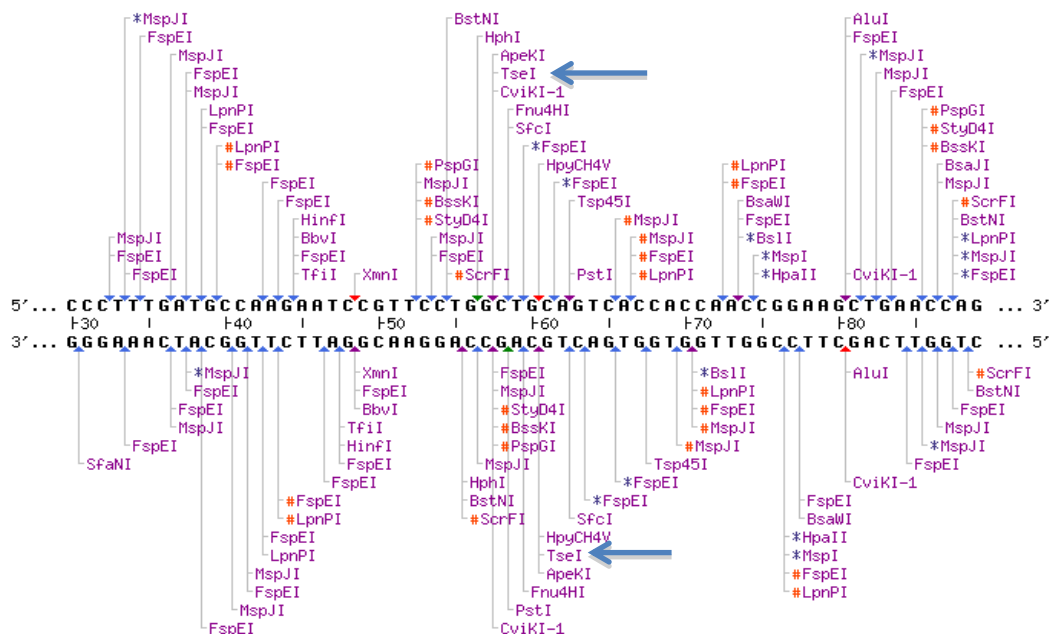
183. Nagase, K., et al., *Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(2): p. 113-7.
184. Zahir, H., et al., *Changes in tacrolimus distribution in blood and plasma protein binding following liver transplantation*. Ther Drug Monit, 2004. **26**(5): p. 506-15.
185. Cheng, P.Y. and E.T. Morgan, *Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states*. Curr Drug Metab, 2001. **2**(2): p. 165-83.
186. Greenblatt, D.J., et al., *Effect of age, gender, and obesity on midazolam kinetics*. Anesthesiology, 1984. **61**(1): p. 27-35.
187. Skottheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. Eur J Pharm Sci, 2008. **33**(4-5): p. 317-25.
188. Oneda, B., et al., *The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test*. Pharmacogenet Genomics, 2009. **19**(11): p. 877-83.
189. Elens, L., et al., *CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy*. Pharmacogenomics, 2013. **14**(1): p. 47-62.
190. Lin, Y.S., et al., *Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 162-72.

Vedlegg

Vedlegg 1. Utskrift fra NebCutter

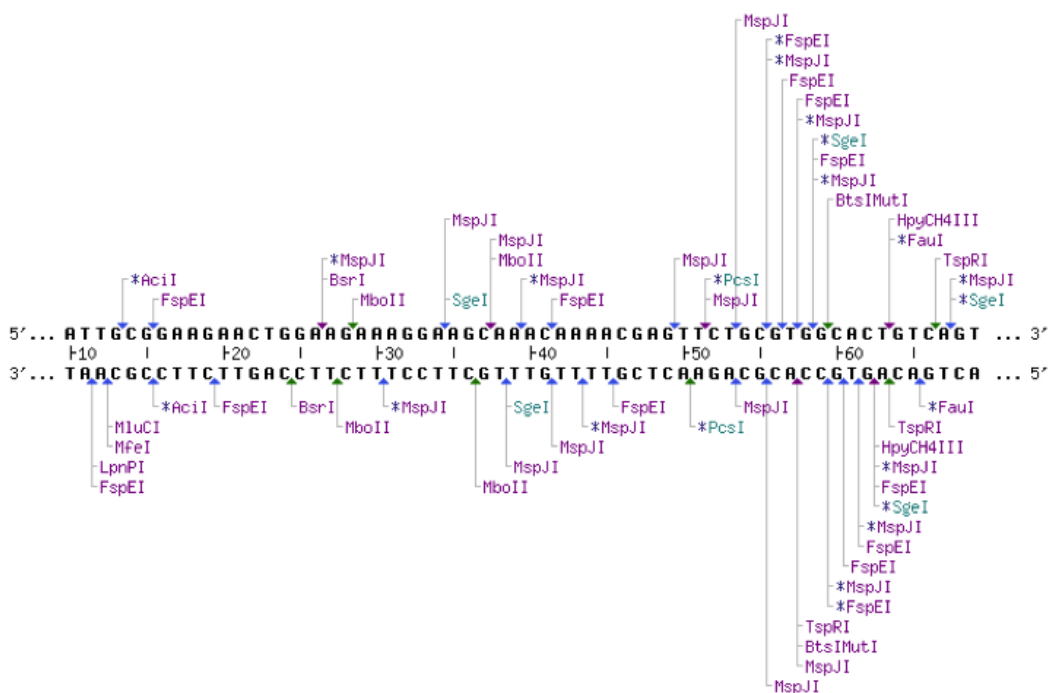
Viser Resultat fra NEBcutter som viser hvor ulike restriksjonsenzymmer kutter(valgt enzym er markert med piler). Utdraget av sekvensene under viser hvordan TseI, EcoR1 og Tsp5091 kutter i dobbeltrådig DNA for *POR*5*, *PPARA(42)* og *PPARA(48)*.

*POR*5*



TseI 5'....G I C W G C....3'
 3'....G G W C I G....5'

PPAR(42)



EcoRI 5'...GIAATT C...3'
3'...C AATT IG...5'

PPAR(48)



Tsp509I 5'...IAATT ...3'
3'... AATT I ...5'

Vedlegg 2. Tabeller med temperatur og konsentrasjonsbetingelser benyttet under optimalisering av PCR.

*Ulike temperaturer og tider for annealing benyttet ved optimalisering av PCR-betingelser for POR*28*

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	68	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	uendelig	1

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	65	30 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	uendelig	1

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	62	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	uendelig	1

Ulike temperaturer og tider for annealing benyttet ved optimalisering av PCR-betingelser for PPARA(42)

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	68	12 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	3 min	1
Hold	4	Uendelig	1

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	70	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	Uendelig	1

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	60	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	Uendelig	1

Prosess	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Initial denaturering	94	5 min	1
Denaturering	94	30 s	40
Annealing	62	20 s	
Elongering	72	30 s	
Fullstendig elongering	72	5 min	1
Hold	4	Uendelig	1

*Optimalisering av PCR-betingelser med hensyn på konsentrasjon av magnesium og primere for POR*28.*

1.	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase 5U/µl	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

2.	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase (5U/µl)	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

3.	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	1 mM	1 mM	1mM	1 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase (5U/µl)	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

Optimalisering av PCR-betingelser med hensyn på konsentrasjon av magnesium og primere for PPARA(42)

Nr 1	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase (5U/µl)	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

Nr 2	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase (5U/µl)	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

Nr 3	Rad 1-2	Rad 3-4	Rad 5-6	Rad 7-8
Reagens	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon	Slutt konsentrasjon
PCR buffer (10x)	1x	1x	1x	1x
MgCl₂ (50mM)	1 mM	1 mM	1mM	1 mM
dNTPmix (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer F (20µM)	0,8 µM	0,4 µM	0,8 µM	0,4 µM
Primer R (20µM)	0,8 µM	0,8 µM	0,4 µM	0,4 µM
Taq DNA polymerase (5U/µl)	1,25 U/µl	1,25 U/µl	1, 25 U/µl	1,25 U/µl
DNA-templat (50ng/ µl)	0,1µg	0,1µg	0,1µg	0,1µg

Vedlegg 3. Mengdeforhold av reagenser ved bruk av PCR

Tabellene viser endelige optimaliserte mengdeforhold og tilsetningsrekkefølge for reagenser benyttet ved PCR. dH₂O; DEPC-behandlet vann, dNTPmix; blanding av nukleotider, Primer F; forward primer, Primer R; reverse primer.

*POR*5.*

Reagens (Utgangskonsentrasjon)	Volum per prøve (µl)	Endelig konsentrasjon
dH ₂ O	38,25	
PCR buffer (10 x)	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	1	0,4 µM
Primer R (20 µM)	1	0,4 µM
Taq Polymerase (5 U)	0,25	1,25 U
DNA templat (50ng/µl)	2	0,1 µg
Total	50	

*POR*28, optimaliserte betingelser 1.*

Reagens (Utgangskonsentrasjon)	Volum per prøve (µl)	Endelig konsentrasjon
dH ₂ O	36,25	
PCR buffer (10 x)	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	2	0,8 mM
Primer R (20 µM)	2	0,8 mM
Taq Polymerase (5 U)	0,25	1,25 U
DNA templat (50 ng/µl)	2	0,1 µg
Total	50	

POR*28, optimaliserte betingelser 2.

Reagens (Utgangskonsentrasjon)	Volum per prøve (µl)	Endelig konsentrasjon
dH ₂ O	37,75	
PCR buffer (10 x)	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	1	1,0 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	1	0,4 mM
Primer R (20 µM)	2	0,8 mM
Taq Polymerase (5 U)	0,25	1,25 U
DNA templat (50ng/ µl)	2	0,1 µg
Total	50	

PPARA(42).

Reagens (Utgangskonsentrasjon)	Volum per prøve (µl)	Endelig konsentrasjon
dH ₂ O	36,75	
PCR buffer (10 x)	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM)	2	2 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	2	0,8 mM
Primer R (20 µM)	1	0,4 mM
Taq Polymerase (5U)	0,25	1,25 U
DNA templat (50ng/µl)	2	0,1 µg
Total	50	

PPARA(48).

Reagens (Utgangskonsentrasjon)	Volum per prøve (µl)	Endelig konsentrasjon
dH ₂ O	36,25	
PCR buffer (10 x)	5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	1	0,2 mM
Primer F (20 µM)	2	0,8 mM
Primer R (20 µM)	2	0,8 mM
Taq Polymerase (5 U)	0,25	1,25 U
DNA templat (50ng/µl)	2	0,1 µg
Total	50	