

UGT1A4 og UGT2B15 enkeltnukleotidpolymorfismer

Etablering av real time PCR metoder
og
betydning for tamoxifen metabolisme

av

Ole-Johan Ness



Masteroppgave i Farmasi

Senter for farmasi og
Institutt for Indremedisin, Seksjon for Endokrinologi
Universitetet i Bergen
Juni 2008

Innholdsfortegnelse

	Side
Innholdsfortegnelse	1
Forord	3
Forkortelser	4
1. Sammendrag	5
2. Innledning	7
2.1 Legemiddelmetabolisme	7
2.2 Glukoronidering og UGT familien	7
2.3 Tamoxifenbehandling av brystkreft	9
2.4 Farmakokinetikk og metabolisme for tamoxifen	10
2.4.1 Absorpsjon	10
2.4.2 Distribusjon	11
2.4.3 Metabolisme av tamoxifen	12
2.4.4 Eliminering av tamoxifen	15
2.4.5 Innvirkning av polymorfismer på tamoxifenmetabolismen	16
3. Målsetning med prosjektet	18
4. Materialer	19
4.1 Biologisk materiale	19
4.2 Buffere	19
4.3 Kit liste	20
4.4 Kjemikalie liste	22
4.5 Markører	22
4.6 Oligonukleotider	23
4.7 Prober	23
4.8 Utstysliste	24
4.9 Andre materialer	25
5. Metoder	26
5.1 Rensing av gDNA	26
5.2 UV til synlig lys spektroskopi	27
5.3 Polymerase Chain Reaction	28
5.3.1 Generelt om PCR	28
5.3.2 Vanlig Polymerase Chain Reaction for UGT1A4 og UGT2B15	29
5.3.3 Generelt om Real time PCR	30
5.3.4 Real time PCR med UGT1A4	31
5.4 Agarose gelelektroforese	33
5.5 Ekstraksjon av PCR produkt fra agarose gel	34
5.6 Sekvenseringsreaksjon med PCR	35
5.7 Statistiske analyser	36
6. Resultater	38
6.1 Real time PCR	38
6.1.1 Etablering av real time PCR metode for UGT1A4	38
6.1.2 Identifikasjon av UGT1A4 genotype	42
6.1.3 Forsøk på etablering av real time PCR metode for UGT2B15	45
6.2 Relasjon mellom UGT1A4 allele og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter.	53

7. Diskusjon	59
7.1 Real time PCR	59
7.1.1 Etablering av real time PCR metode for UGT1A4	59
7.1.2 Forsøk på etablering av real time PCR metode for UGT2B15	60
7.2 Relasjon mellom UGT1A4 allele og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter.	61
8. Konklusjon	66
9. Forslag til fremtidig forskning.	68
10. Referanser	70

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven har blitt utført ved Institutt for Indremedisin, Seksjon for Endokrinologi ved Universitetet i Bergen i perioden April 2007 til Juni 2008. Arbeidet med mastergraden utgjør den siste delen av profesjonstudiet i farmasi ved Senter for farmasi, Universitetet i Bergen. Ernst Lien har vært min hovedveileder, mens Gunnar Mellgren og Marianne Hauglid har vært biveiledere. Jeg takker Ernst for hjelp til planlegging og organisering av masteroppgaven samt veiledning i skriveprosessen. Jeg takker Gunnar for råd og innspill til masteroppgaven. Jeg vil også takke Jennifer Gjerde for hjelp med de statistiske analysene og Simon Dankel for råd og tips til tegning av figurer. I tillegg vil jeg spesielt takke Marianne Hauglid for opplæring i molekylærbiologiske metoder og for nyttige innspill ved skriving ved masteroppgaven.

Det har vært kjekt å arbeide med masteroppgaven og det skyldes både at det har vært et interessant og givende arbeid og det gode miljøet ved avdelingen. Derfor retter jeg en generell takk til alle ved Institutt for Indremedisin, Seksjon for Endokrinologi og Hormonlaboratoriet, Haukeland Universitetssykehus for et godt arbeidsmiljø.

Forkortelser

NDTAM	N-demetyltamoxifen
4OHTAM	4-hydroxytamoxifen
4OHNDTAM	4-hydroxy-N-demetyltamoxifen (Endoxifen)
NDDTAM	N-dedimetyltamoxifen
TAMNox	Tamoxifen-N-oxid
A	Adenin
Asp (D)	Asparbinsyre
C	Cytosin
FSH	Follikel stimulerende hormon
G	Guanin
gDNA	genomisk DNA
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IE	Internasjonal Enhet (IU: Inter)
Leu (L)	Leucin
ml	mililiter
MS	Massespektrometri (Mass Spectrometry)
ng	nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
SHBG	Seksual hormon bindende globulin
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
Tyr (Y)	Tyrosin
UDP	Uridin-difosfat (Uridine diphosphate)
UGT	UDP-glykosyltransferase
Val (V)	Valin
Vt	Variant type
Wt	Wild type (Vill type)

1. Sammendrag

Brystkreft er den vanligste kreftformen blant kvinner i Norge og adjuvant tamoxifenbehandling er vist å øke tilbakefallsfri og total overlevelse. Den interindividuelle variasjonen i effekt og bivirkninger av tamoxifen er betydelig. Det er ikke etablert noen klar sammenheng mellom serumkonsentrasjon av tamoxifen og effekt av behandlingen, men også for serumkonsentrasjonen er det betydelig interindividuell variasjon. Det er uklart hvilke molekylære mekanismer som ligger bak de interindividuelle variasjonene. Tamoxifen gjennomgår en omfattende metabolisme og to av metabolittene, 4-hydroxytamoxifen og 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen, bidrar til den farmakologiske virkningen av tamoxifen. Det er mulig at økt kunnskap om forholdene som påvirker metabolismen av tamoxifen kan gi en bedre forståelse av årsakene til den interindividuelle variasjonen av effekt, bivirkninger og serumkonsentrasjon. UGT-enzymene konjugerer glukuronsyre med xenobiotika og endogene stoffer, som dermed får økt vannløselighet. Flere UGT-zymer bidrar i fase II metabolismen av tamoxifen og metabolitter. I denne masteroppgaven har det blitt etablert en real time PCR metode for å identifisere enkeltnukleotidpolymorfismen UGT1A4^{142 T>G}, som fører til en endring i aminosyresekvensen fra 48 Leu til 48 Val. Sammenligning av resultater fra real time PCR med resultater fra sekvensering bekrefter at real time PCR metoden fungerer. Metoden ble deretter brukt til å kartlegge fordelingen av genotypene UGT1A4*1 (142 T) og UGT1A4*3 (142 G) i et materiale på 182 pasientprøver, som har fått adjuvant tamoxifenbehandling. UGT1A4 er viktig for fase II metabolismen av tamoxifen og deltar i fase II metabolismen av 4-hydroxytamoxifen. En tidligere studie har rapportert at UGT1A4^{48 Val} har høyere enzymatisk aktivitet enn UGT1A4^{48 Leu} ved glukuronidering av tamoxifen. Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant sammenheng mellom UGT1A4 genotype og serumkonsentrasjonen av tamoxifen og metabolittene 4-hydroxytamoxifen, 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen, N-demetyltamoxifen, N-dedimetyltamoxifen og tamoxifen-N-oxid.

Det ble gjort en rekke forsøk på å etablere en real time PCR metode for å identifisere enkeltnukleotidpolymorfismen UGT2B15^{253 G>T}. Det viste seg at primerene hybridiserte med både UGT2B15 og UGT2B17. Det er 95 % sekvenslikhet mellom de to genene og det har derfor vist seg å være vanskelig å oppnå spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 med primerne som ble brukt i forsøkene. UGT2B15 deltar i fase II metabolismen av de farmakologisk aktive metabolittene 4-hydroxytamoxifen og 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen. Det er rapportert at varaint typen av UGT2B15 har høyere enzymatisk aktivitet ved glukuronidering av

androgener enn villtypen. I en tidligere studie av UGT2B15 genotype og effekt av tamoxifenbehandling ble det funnet en trend for tilbakekomst av brystkreft hos pasienter med den høyaktive varianten av UGT2B15. Det vil derfor være interessant å undersøke sammenhengen mellom serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter og UGT2B15 genotype.

Konklusjon: Det er vist at real time PCR kan brukes til å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen UGT1A4^{142 T>G}. Metabolismen av tamoxifen er omfattende og det gjenstår å finne molekylære mekanismer som kan forklare den interindividuelle variasjonen ved tamoxifenbehandling.

2. Innledning

2.1 Legemiddelmetabolisme

Metabolisme av legemidler innebærer biotransformasjon av kjemiske forbindelser. Det er vanlig å dele det inn i to klasser av biokjemiske reaksjoner [1-3]. Felles for begge typene av biokjemiske reaksjoner er at de bidrar til å gjøre forbindelsen mer vannløselig og dermed lettere å skille ut. Den ene typen av reaksjoner kalles fase I reaksjoner og den andre typen kalles fase II reaksjoner. I fase I reaksjoner blir det introdusert eller avdekket en polar gruppe som f.eks OH, COOH og SO₃H. Oksidasjon, reduksjon og hydrolyse er de viktigste fase I reaksjonene. Produktene fra fase I reaksjoner er som regel mer kjemisk reaktive på grunn av den funksjonelle gruppen som er blitt introdusert eller avdekket. Fase II reaksjoner består av konjugeringsreaksjoner. Acetylering, sulfatkonjugering, aminosyrekonjugering, glukuronsyrekonjugering, glutathionkonjugering og metylering er de viktigste fase II reaksjonene. Produktene fra fase II reaksjoner har økt vannløselighet ved at en polar forbindelse er kombinert med en lite vannløselig forbindelse (i denne sammenhengen vil det si et legemiddel).

Metabolisme av legemidler kan finne sted i alle vev og i de fleste biologiske væsker, Det viktigste vevet for metabolisme av legemidler er leveren. De viktigste eliminasjonsveiene for både uendrede legemidler og metabolitter av legemidler er via nyrene og via lever og galleveiene til faeces. I tillegg fungerer lungene som eliminasjonsveg for flyktige forbindelser som f.eks en del anestesimidler. Blant de nevnte eliminasjonsveiene er utskilling via nyrene den vanligste ruten for eliminasjon av både metabolitter og uendrede legemidler.

2.2 Glukuronidering og UGT familien

Konjugering med glukuronsyre er en viktig metabolismerute for legemidler og xenobiotika som har en eller flere funksjonelle grupper som for eksempel alkoholer, fenoler, aminer, tioler og karboksylsyrer. Konjugater av glukuronsyre har betydelig økt vannløselighet i forhold til substratet for reaksjonen.

UDP-glykosyltransferase (UGT) er en gen-superfamilie i dyr, planter og bakterier, som koder for enzymer som konjugerer glykosylgrupper som f.eks glukose, galaktose, glukuronsyre og xylose med et substrat [4, 5]. Navnet UDP-glykosyltransferaser brukes om gen-superfamilien fordi de forskjellige enzymene benytter ulike suktermolekyler til konjugeringsreaksjonene. Mammalske UGT-enzymene benytter for en stor del glukuronsyre som sukkerdonor [6, 7]. Derfor brukes navnet UDP-glukuronsyretransferase ofte i litteraturen om mammalske og humane UGT-enzymene [4, 8-10].

Den mammalske gen-superfamilien deles inn i de fire familiene UGT1, UGT2, UGT3 og UGT8 [4]. De humane UGT-genene og de tilhørende enzymene vil bli kort beskrevet i det følgende. UGT1-genene er lokalisert til kromosom 2q37 og inneholder 13 individuelle promotorer. Medlemmene av UGT1-familien består av 5 exoner der de fire siste er felles for alle medlemmene, mens det første exonet er unikt for det enkelte gen. Fire av de potensielle genene inneholder mutasjoner og er pseudogener. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5 og UGT1A6 kan kobles til et funksjonelt protein, mens det gjenstår å koble fire av genene til et protein. UGT1 familien bruker fortrinnsvis glukuronsyre ved konjugering, men kan også bruke andre glykosylgrupper. UGT2 familien er lokalisert til kromosom 4q13 og deles inn i de to subfamiliene UGT2A og UGT2B. UGT2A subfamilien har tre medlemmer, mens UGT2B subfamilien har 12 medlemmer. For UGT2A2 gjenstår det å koble transkriptet til et funksjonelt protein. I UGT2B subfamilien kan syv av transkriptene kobles til et funksjonelt protein, mens de resterende fem medlemmene er pseudogener. Innenfor hver av de to subfamiliene er det mer enn 70 % prosent sekvenslikhet mellom medlemmene. I likhet med UGT1 familien bruker UGT2 familien fortrinnsvis glukuronsyre ved konjugering. Hos mennesker består UGT3 familien av to gener UGT3A1 og UGT3A2 som er lokalisert til kromosom 5p13.2. Den fysiologiske funksjonen og distribusjonen av UGT3 enzymer er enda ikke beskrevet. Det er også ukjent hvilken glykosylgruppe som fortrinnsvis blir brukt av UGT3 enzymene. UGT8 er lokalisert til kromosom 4q26 og består av ett enkelt gen, som koder for UDP galaktose-ceramid-galaktosyltransferase. Som navnet indikerer blir galaktose brukt ved konjugeringsreaksjoner katalysert av UGT8A1.

2.3 Tamoxifen-behandling av brystkreft

Brystkreft er den vanligste kreftformen blant kvinner i Norge [11]. I den vestlige del av verden er livstidsrisikoen for å utvikle brystkreft estimert til å være minst 7,8 % [12]. Tamoxifen er det mest brukte legemiddelet til behandling av brystkreft, og adjuvant tamoxifenbehandling av østrogenreseptor positiv brystkreft gir signifikant økning i tilbakefallsfri og total overlevelse [13-15].

Tamoxifen virker ved å binde til østrogenreseptoren. Dermed blokkeres østrogenbinding til reseptoren og østrogenregulert ekspresjon blir inhibert [15, 16]. Denne forklaringsmodellen for virkningen av tamoxifen bygger på teorien om at binding av østrogenreseptoren til promotorområder i DNA stimulerer overlevelse, vekst og celledeling av brystceller [16, 17]. Tamoxifen kan ha både agonistisk og antagonistisk effekt avhengig av vevet. Den antagonistiske effekten er den ønskede ved adjuvant behandling av brystkreft. I tillegg er bivirkninger av tamoxifen som vaginal blødning og hetetokter relatert til den antagonistiske virkningen av tamoxifen [15]. Den agonistiske virkningen av tamoxifen er knyttet til sjeldne, men alvorlige bivirkninger av tamoxifenbehandling. Det er påvist at tamoxifenbehandling øker risikoen for kreft i endometriet [18] og økt risiko for venøs tromboembolisme [19]. Enkelte resultater tyder på at den agonistiske virkningen av tamoxifen kan føre til redusert risiko for iskemisk hjertesykdom og osteoporose ved tamoxifenbehandling [20-23]. I litteraturen er det også beskrevet en betydelig variasjon av både effekt og bivirkninger ved tamoxifen behandling [13, 15]. Årsaken til variasjonen er enda uklar, men variasjon i metabolisme og dermed farmakokinetikk av tamoxifen og dens metabolitter har blitt foreslått som en mulig forklaringsmodell [24-28].

Tre tiår etter introduksjonen av tamoxifen har legemiddelet fortsatt en viktig rolle ved kjemoterapeutisk behandling av brystkreft. Både effekten ved tamoxifenbehandling og bivirkninger er godt dokumentert. Fremdeles gjenstår det forskning innenfor flere områder for å forstå faktorer som påvirker den farmakologiske virkningen til tamoxifen. De siste årene er det utført mye forskning på metabolismen av tamoxifen og eventuelle konsekvenser for farmakokinetikk og effekt av tamoxifenbehandling.

2.4 Farmakokinetikk og metabolisme av tamoxifen

Grunnleggende studier og beskrivelser av farmakokinetikken til tamoxifen er foretatt av blant andre Fromson et.al, Lønning et. al, Adam et al, Lien et.al og Stearns et al [29-34]. I nyere tid er det foretatt en rekke studier av innvirkningen sentrale enzymer har på metabolisme og farmakokinetikk [24-26, 35-43] og på den farmakologiske betydningen av sentrale metabolitter [34, 44-47]. I det følgende vil sentrale parametre for farmakokinetikken og metabolismen til tamoxifen bli oppsummert.

2.4.1 Absorpsjon

Det antas at absorpsjonen av tamoxifen gitt oralt som tabletter fra den gastro intestinale trakt er god, og nær 100 %. Antakelsen er allment godtatt selv om det kun finnes mangelfulle studier av absorpsjonen av tamoxifen. Dyreforsøk utført av Fromson med intravenøs administrasjon av tamoxifen til rotter og oral administrasjon til hunder viste lignende eliminasjonsmønster etter oral og intravenøs administrasjon [31]. I en annen studie ble en enkeltdose på 20 mg tamoxifen gitt som henholdsvis tabletter og som en vandig løsning til friske mannlige frivillige. Deretter ble serumkonsentrasjonen av tamoxifen og N-demetyltamoxifen (NDTAM) undersøkt og sammenlignet for de to administrasjonsformene. Dataene viste at absorpsjon fra tabletter og fra vandig løsning ikke var signifikant forskjellig [29]. En svakhet ved studien er at det er to orale formuleringer som ble sammenlignet og de biologiske forhold som påvirker absorpsjonen vil da være relativt like.

For mennesker finnes det ikke noen studier som sammenligner intravenøs og oral administrasjon. Derimot finnes det en studie som sammenlignet oral og rektal administrasjon av tamoxifen. Studien viste at biotilgjengeligheten ved rektal administrasjon var på kun 30 % i forhold til ved oral administrasjon [48]. Biotilgjengeligheten av et legemiddel påvirkes av både absorpsjonen og førstepassasjemetabolisme. Ved oral administrasjon vil et legemiddel påvirkes i større eller mindre grad av førstepassasjemetabolisme. Det mangler gode studier av førstepassasje metabolismen av tamoxifen hos mennesker, og kunnskapen er derfor basert på begrensede studier, dyreforsøk og antagelser. Siden tamoxifen gjennomgår en omfattende metabolisme av både fase I og fase II reaksjoner er det rimelig å anta at tamoxifen blir utsatt for en viss grad av førstepassasjemetabolisme. De eneste tilgjengelige data som er relevante

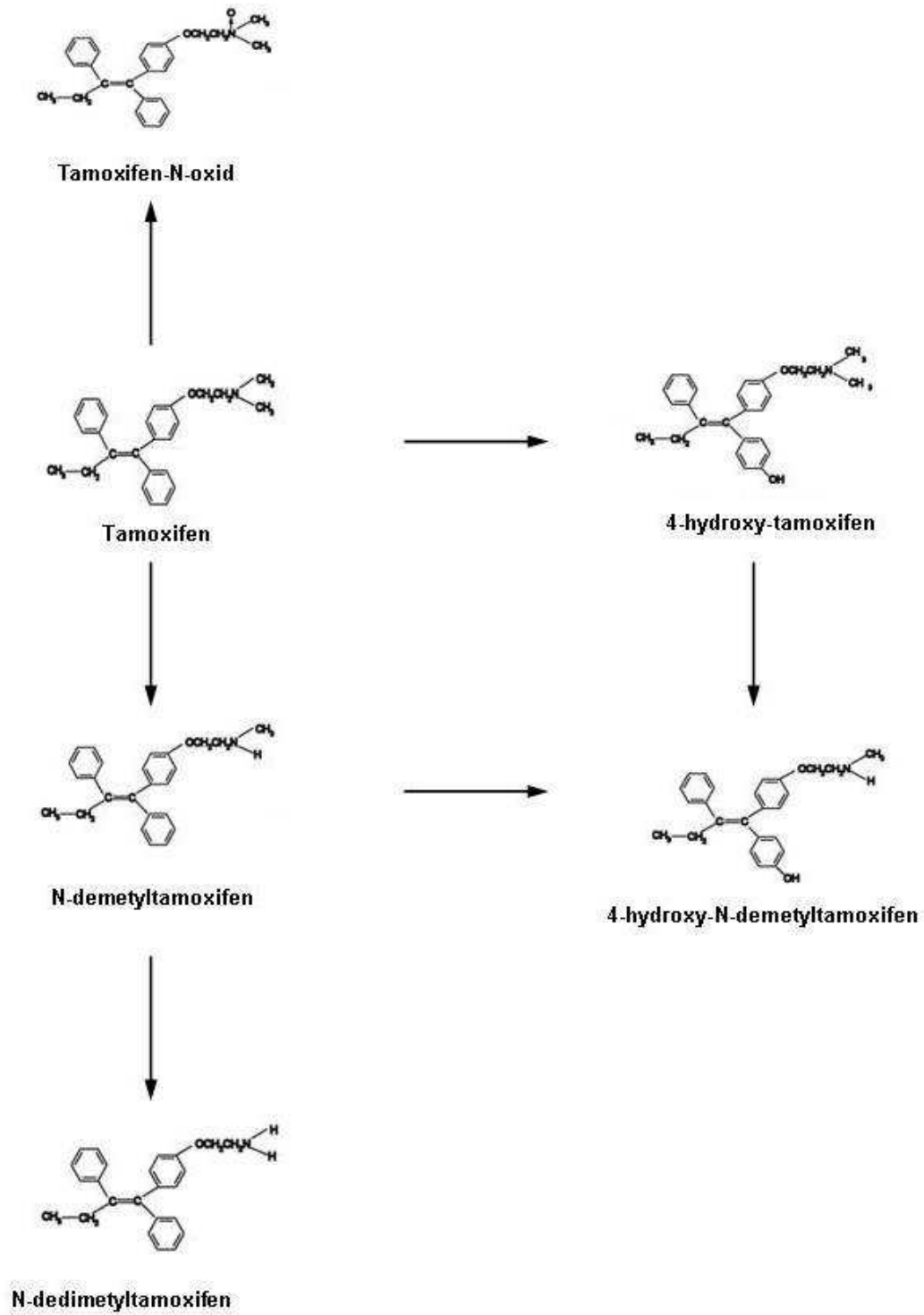
angående førstepassasje metabolisme er fra Fromson. Tamoxifen ble merket med ^{14}C og serum prøver ble tatt etter 1 og 4 timer. Verdiene for 1 til 4 timer viste at 33 % av det merkede materialet var uforandret tamoxifen, 9 % var 4-hydroxytamoxifen (4OHTAM) og den resterende andelen av det merkede materialet bestod av andre metabolitter [30]. Disse dataene tyder på at tamoxifen kort tid etter administrasjon gjennomgår en omfattende metabolisme og det er trolig at noe av dette skyldes førstepassasjemetabolisme. Siden de tilgjengelige data for absorpsjon og førstepassasjemetabolisme av tamoxifen er begrensede og til dels mangelfulle, er det vanskelig å fastslå biotilgjengeligheten av tamoxifen.

2.4.2 Distribusjon

I forsøk utført av Fromson ble maksimal serum konsentrasjon av tamoxifen oppnådd etter 4-7 timer [30]. I studien utført av Adam med 6 mannlige frivillige ble maksimal serumkonsentrasjon av tamoxifen oppnådd etter ca 5 timer [29]. Dataene fra studiene ligger innenfor det samme tidsintervallet og det er derfor en rimelig tolkning at begge verdiene for t_{\max} er et uttrykk for den samme gjennomsnittsverdien for t_{\max} med interindividuelle variasjoner. I serum er proteinbindingen av tamoxifen og flere av metabolittene målt til å være høyere enn 98 %, og Albumin er det viktigste proteinet for binding av tamoxifen og metabolitter [32]. Ved kontinuerlig administrasjon av 20 mg tamoxifen er det rapportert at steady state (C^{SS}) er oppnådd etter 4-8 uker [49]. Den rapporterte tiden for å oppnå steady state er i samsvar med opplysninger i preparatomtalene for tamoxifen Merc og Nolvadex der det opplyses om at steady state nås etter 4 uker ved kontinuerlig administrasjon av 20 eller 40 mg tamoxifen [50, 51]. Distribusjonsvolumet ved kontinuerlig administrasjon av tamoxifen har blitt beregnet til 50-60 liter/kg ved steady state under forutsetning om at absorpsjonen ved oral administrasjon er 100 % [32]. Ved kontinuerlig behandling med tamoxifen er det rapportert at serumkonsentrasjonen av tamoxifen og metabolitter er stabil i opptil flere år etter at steady state nivå er oppnådd [52]. Den interindividuelle variasjonen i serumkonsentrasjon ved steady state er derimot rapportert til å være på inntil 10 gangers forskjell mellom laveste og høyeste observerte verdi ved steady state [52-54]. Det finnes ingen data som korrelerer serumkonsentrasjon av tamoxifen ved steady state til effekten av behandlingen [55, 56]. Det vil si at det ikke etablert noen klar sammenheng mellom serum konsentrasjon eller dosering av tamoxifen og effekt av behandlingen, som også står nevnt i produktomtalene [50, 51].

2.4.3 Metabolisme av tamoxifen

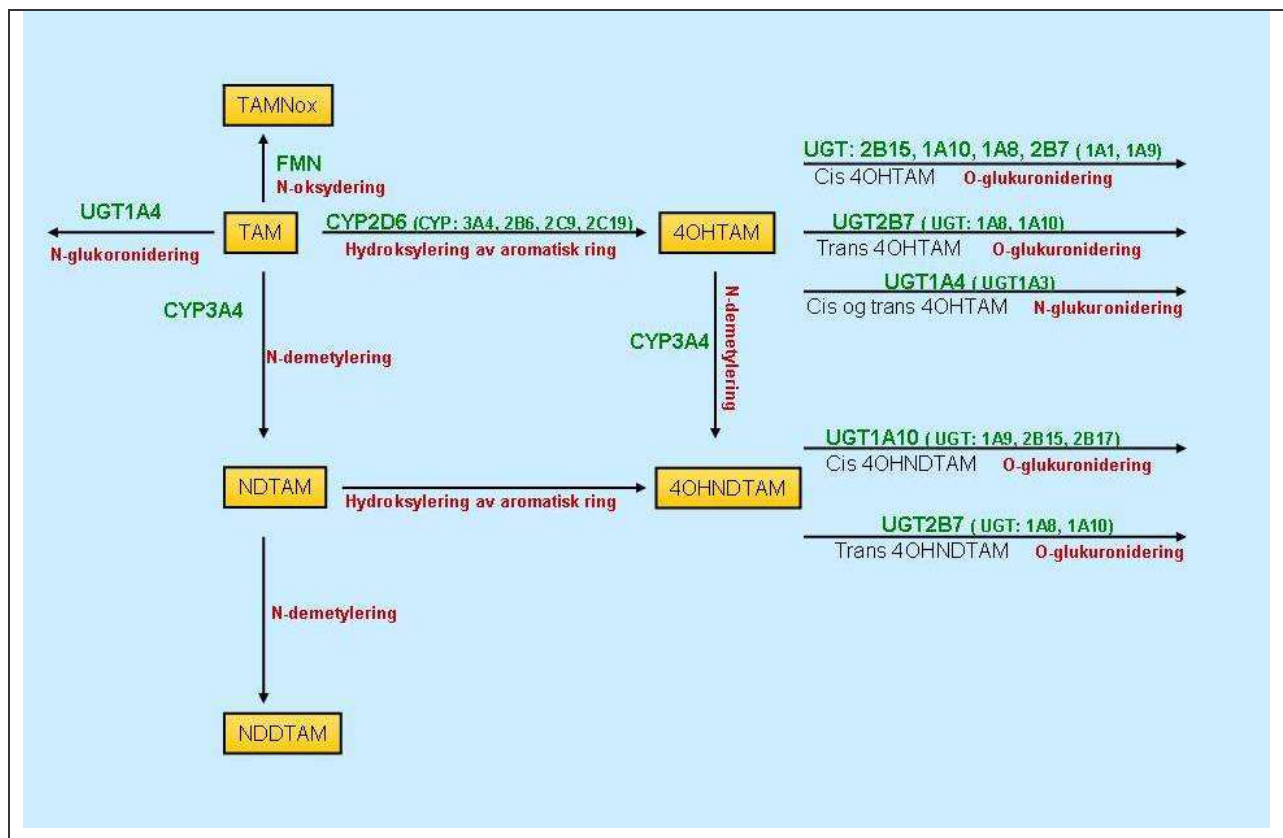
Tamoxifen blir utsatt for en omfattende fase I metabolisme og flere av metabolittene er farmakologisk aktive. Metabolittene og de viktigste reaksjonsveier og de mest sentrale enzymene er beskrevet. De viktigste fase I reaksjonen for tamoxifen er oksidasjon, hydroxylering og demetylering. En viktig fase I reaksjon er N-demetylering av tamoxifen til NDTAM. Videre blir tamoxifen og NDTAM hydroksylert til henholdsvis 4-hydroxytamoxifen (4OHTAM) og 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen (4OHNDTAM). Videre vil 4OHTAM bli demetylert til 4OHNDTAM, som i enkelte sammenhenger blir omtalt som Endoxifen [34]. I tillegg blir NDTAM demetylert til N-dedimetyltamoxifen (NDDTAM). I tillegg til de ovenfor nevnte reaksjonen er N atomet på sidekjeden til tamoxifen utsatt for oksidasjon og metabolitten tamoxifen-N-oxid (TAMNox) dannes. Figur 2.4.3.a viser struktur og navn til tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og NDDTAM.



Figur 2.4.3.a Struktur av tamoxifen og metabolittene TAMNox, NDTAM, NDDTAM, 4OHTAM og 4OHNDTAM. Metaboliseringsveiene for tamoxifen er indikert med piler.

Det er gjennomført flere *in vitro* studier for å bestemme hvilke enzymer som bidrar til fase I metabolisme av tamoxifen. Hydroksyleringen av tamoxifen til 4OHTAM blir hovedsakelig katalysert av CYP2D6 og CYP2C9 mens CYP2B6 også bidrar [35, 36, 38]. Enkelte resultat tyder også på en viss aktivitet av CYP2C19 og CYP3A4 [35, 36], men bidraget fra CYP3A4 er omdiskutert [35]. Studier av N-demetyleringen har vist at CYP3A4 katalyserer reaksjonen som går fra tamoxifen til NDTAM [36]. I en nyere studie er det vist at CYP3A er viktig for den videre demetyleringen fra NDTAM til NDDTAM [24]. I den samme studien blir det rapportert at CYP3A4 er avgjørende for demetyleringen av 4OHTAM til 4OHNDTAM. Det ble også rapportert at biotransformasjonen av NDTAM til 4OHNDTAM blir katalysert av CYP2D6 og at den sistnevnte ruten er den viktigste metabolismevegen for dannelsen av den farmakologisk viktige metabolitten 4OHNDTAM.

De viktigste fase II reaksjonene for tamoxifen og metabolitter er glukuronidering og sulfatering. I en studie er det vist at UGT1A4 katalyserer N-glukuronidering av tamoxifen [40]. Det er vist at UGT2B15 er viktig ved O-glukuronidering av cis 4OHTAM [57]. Seinere er det blitt vist at UGT1A4 deltar ved N-glukuronidering av både cis og trans 4OHTAM [41, 42]. I tillegg til glukuronidering har SULT1A1 sulfatering av 4OHTAM blitt [25, 26, 39] studert. I en relativt nylig studie [43], ble det rapportert at UGT2B7 er den viktigste UGT varianten ved O-glukuronidering av trans 4OHTAM og trans 4OHNDTAM. I tillegg ble det funnet at UGT1A8 og UGT1A10 bidrar ved O-glukuronidering av trans 4OHTAM og trans 4OHNDTAM. UGT1A10, UGT1A8, UGT2B7 og UGT2B15 ble rapportert å være viktige for O-glukuronideringen av cis 4OHTAM, mens både UGT1A1 og UGT1A9 ble rapportert å delta i O-glukuronideringen av cis 4OHTAM. For cis 4OHNDTAM ble UGT1A10 rapportert å ha den høyeste enzymatiske aktiviteten mens UGT1A9, UGT2B15 og UGT2B17 også deltok i O-glukuronideringen av cis 4OHNDTAM. Et negativt resultat fra studien som bør nevnes er at det ble ikke funnet noen N-glukuronidering av 4OHNDTAM. Fra før er det kjent at UGT-enzymene katalyserer N-glukuronidering av tamoxifen og 4OHTAM. En mulig forklaring av fraværet av N-glukuronidering av 4OHNDTAM er at N-demetyleringen har endret forutsetningene for reaksjonen slik at N-glukuronidering ikke lenger er mulig [43]. Fra faeces, galle og urin er både tamoxifen og metabolitter hovedsakelig isolert som polare konjugater med f.eks glukuronsyre [30, 56]. Det er derfor trolig at sulfatering og glukuronidering er viktige fase II reaksjoner også for de andre tamoxifen metabolittene selv om spesifikke studier mangler for enkelte metabolitter. Figur 2.4.3.b viser en skjematisk oversikt over enzymene som bidrar i fase I og fase II metabolisme av tamoxifen og metabolittene TAMNox, NDTAM, NDDTAM, 4OHTAM og 4OHNDTAM.



Figur 2.4.3.b Enzymkart for fase I og II metabolisme av tamoxifen. Figuren viser tamoxifen og de fem metabolittene tamoxifen-N-oxid (TAMNox), 4-hydroxytamoxifen (4OHTAM), N-demetyltamoxifen (NDTAM), 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen (4OHNDTAM) og N-demetyltamoxifen (NDDTAM). Pilene viser metaboliseringsveiene og teksten beskriver de enzymatiske reaksjonene. De vesentligste enzymene i fase I metabolismen av tamoxifen er vist i figuren. UGT1A4, UGT2B15 og de andre UGT enzymene er vist der det er kjent at de bidrar til glukuronidering av tamoxifen og metabolitter.

2.4.4 Eliminering av tamoxifen.

Elimineringen av et legemiddel kan beskrives med halveringstiden for legemiddelet i serum, eventuell enterohepatisk sirkulasjon og utskillingsruter. Halveringstiden for tamoxifen er rapportert til å være fra 4 – 11 dager [29, 30, 49]. I produktomtalen for tablett formuleringer av tamoxifen tilgjengelig for det norske markedet blir halveringstiden oppgitt til å være ca 7 dager ved kontinuerlig administrasjon. I studien utført av Adam blir den gjennomsnittlige halveringstiden etter en enkeltdose av tamoxifen rapportert til å være ca 4 døgn. Videre ble det vist at halveringstiden økte til 6 ^{1/2} døgn etter at tre suksessive doser var gitt med 28 dagers mellomrom. Etter en lengre pause på nærmere 5 måneder var

halveringstiden hos to kontroll personer tilbake på et nivå som tilsvarte den initielle halveringstiden. Resultatene kan tyde på det finner sted en partiell og reversibel inhibering av metabolismen av tamoxifen og metabolitter i leveren [29]. Målbare mengder av tamoxifen og metabolitter har blitt funnet inntil 8 uker i serum og 1 år i vev etter at behandling med tamoxifen er avsluttet. Det tyder på at det tar lang tid før tamoxifen er fullstendig eliminert fra kroppen [33]. Utskillingen av tamoxifen og metabolitter går hovedsakelig fra lever til gallen og videre til faeces. Fromson har beskrevet et tilfelle der oppsamling i 13 dager gjorde det mulig å finne igjen 51 % i faeces og 14 % i urin av den initielle enkelt dosen på 20 mg tamoxifen. For det meste ble tamoxifen og metabolittene utskilt som konjugater. Mengden av tamoxifen som ikke var metabolisert ble gradvis redusert etter hvert mens andelen av konjugater forble konstant [30]. I dyreforsøk utført av Fromson er det vist en betydelig enterohepatisk sirkulasjon og det er trolig at dette også er tilfelle for mennesker [31]. En betydelig grad av enteroheptaisk sirkulasjon vil i så fall forklare den lange halveringstiden til tamoxifen.

2.4.5 Innvirkning av polymorfismer på metabolismen av tamoxifen

Enzymene som er sentrale i metabolismen til tamoxifen inneholder flere kjente polymorfismer og virker inn på deres funksjon. Disse polymorfismene kan dermed ha innvirkning på metabolisering, og videre effekten av tamoxifenbehandling I en studie av Nowell blir konsekvensen av en SULT1A1 polymorfisme der arginine blir erstattet av histidin undersøkt [25]. Den vanligst forekommende varianten av SULT1A1 benevnes SULT1A1*1, mens polymorfismevarianten benevnes SULT1A1*2. Sammenligning av de to variantene viser at den enzymatiske aktiviteten er halvert med SULT1A1*2 i forhold til med SULT1A1*1. Studien viste en klar assosiasjon mellom alleltype og effekt av tamoxifenbehandling. Pasienter som var homozygote for SULT1A1*2 hadde signifikant høyere risiko for død enn de som var heterozygote eller homozygote for SULT1A1*1 [25]. Resultatene tyder på at sulfatering av den farmakologisk aktive metabolitten 4OHTAM er fordelaktig. Det ble presentert tre biologiske forklaringsmodeller for resultatet. Den første forklaringsmodellen var at sulfateringen endrer reseptorbindingen av 4OHTAM på en gunstig måte. Forklaring nummer to var at sulfateringen reduserer elimineringen av 4OHTAM der mekanismen er reabsorpsjon av sulfatert 4OHTAM fra nyrene og dermed økt tilgjengelighet

av metabolitten. Den tredje foreslåtte forklaringen var at sulfatering induserte SULT1A1 aktivitet med økt sulfatering og utskilling av andre ugunstige forbindelser som resultat [25].

En viktig fase I reaksjon for tamoxifen er den CYP2D6 katalyserte hydroxyleringen som leder til de farmakologisk aktive metabolittene 4OHTAM og 4OHNDTAM. Disse metabolittene har mange ganger så sterk affinitet for østrogenreseptoren som tamoxifen, og blir derfor regnet for å ha stor betydning for effekten av tamoxifenbehandling [45, 47, 58]. Det har blitt rapportert at serumkonsentrasjonen av 4OHNDTAM er lavere hos kvinner med en lav aktiv variant av CYP2D6 enn hos kvinner med en normal variant av CYP2D6 [34]. I en relativt nylig publisert studie ble det rapportert om økt serumkonsentrasjon av 4OHTAM og 4OHNDTAM hos pasienter med en høyaktiv CYP2D6 allel [39]. I en tidligere publisert studie ble det ikke funnet noen sammenheng mellom CYP2D6*4 genotypen og effekt av tamoxifenbehandling [26]. Det ble oppgitt som en svakhet ved studien at kun sammenheng mellom CYP2D6*4 genotypen og effekt av behandlingen ble undersøkt, mens andre relevante lavaktivitet-genotyper ble utelatt fordi de ikke forekom i tilstrekkelig grad i utvalget. I den samme studien ble det rapportert en ikke signifikant trend for tilbakekomst av brystkreft ved tamoxifenbehandling hos pasienter som hadde en høyaktiv UGT2B15 variant. Høy aktivitet av et enzym som glukuroniderer en aktiv metabolitt vil føre til økt utskilling av metabolitten. Det er derfor som forventet at en ser en noe redusert effekt av tamoxifen behandling ved en høyaktiv variant av UGT2B15 [26]. Et annet enzym som deltar i glukuronideringen av tamoxifen og metabolitten 4OHTAM er UGT1A4. Det har blitt rapportert at en variant av UGT1A4^{48Val} har økt enzymatisk aktivitet sammenlignet med den vanlige varianten UGT1A4^{48Leu} mot 4OHTAM. Dermed er det mulig at UGT1A4 genotypen kan påvirke metabolismen og elimineringen av 4OHTAM. Siden 4OHTAM er en farmakologisk aktiv metabolitt kan også effekten av tamoxifenbehandling bli påvirket [42].

3. Målsetning med prosjektet

Hensikten med denne studien har vært todelt. Det primære målet var å etablere real time PCR metoder for å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismene UGT1A4 142 T>G og UGT2B15 253 G>T. Det sekundære målet var å undersøke betydningen av UGT-enzymene UGT1A4 og UGT2B15 i fase II metabolismen av tamoxifen. Det var av spesiell interesse å undersøke om enkelt nukleotidpolymorfismene UGT1A4 142 T>G og UGT2B15 253 G>T har noen innvirkning på fase II metabolismen av tamoxifen og metabolitter.

De konkrete målsetningene var:

1. UGT1A4

- 1.1 Etablere en real time PCR metode med hybridiserende prober for å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen UGT1A4 142 T>G.
- 1.2 Kartlegge forekomsten av enkelt nukleotidpolymorfismen i prøvematerialet.
- 1.3 Undersøke om det er noen sammenheng mellom UGT1A4 alleltype og serumkonsentrasjonene av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OH-NDTAM og NDDTAM.

2. UGT2B15

- 2.1 Etablere en real time PCR metode med hybridiserende prober for å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen UGT2B15 253 G>T.
- 2.2 Kartlegge forekomsten av enkelt nukleotidpolymorfismen i prøvematerialet.
- 2.3 Undersøke om det er noen sammenheng mellom UGT2B15 alleltype og serumkonsentrasjonene av tamoxifen, TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OH-NDTAM og NDDTAM.

4. Materialer

4.1 Biologisk materiale

Kaukasiske kvinner med brystkreft ble rekruttert fra Haukeland Universitetssykehus, St. Olav Universitetssykehus og Førde Sentralsykehus. Rekrutteringen foregikk i tidsrommet Oktober 2002 til Oktober 2003 og er tidligere beskrevet av J.Gjerde [39]. Studien er vurdert og godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Skriftlig samtykke ble gitt av alle deltakere. Kvinnene var i alderen 32-85 år med median alder 52 år. Det var to viktige kriterier for å bli inkludert i studien. Alle deltakere skulle ha østrogen og / eller progesteron reseptor positiv brystkreft. I tillegg ble kun pasienter som var adjuvant behandlet med 20 mg tamoxifen i minst 80 dager inkludert i studien. Den siste begrensningen er valgt på grunn av den lange halveringstiden til tamoxifen og for å sikre at steady state nivå av legemiddel og metabolitter var oppnådd [33, 52].

4.2 Buffere

Buffer	Innhold	Mengde
TAE lagerløsning (50xTAE)	Tris base	242 g
	Eddiksyre	57,1 ml
	0,5 M EDTA (ph 8,0)	100 ml
Loading buffer	bromophenol blått	0,25 % (vekt/volum)
	Xylene cyanol FF	0,25 % (vekt/volum)
	Glycerol i H ₂ O	30 % (volum/volum)

Tabell 4.2.1 Liste over buffere

4.3 Kit liste

Kit	Innhold	Mengde	Leverandør (Katalog nr.)
QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit (250)	QIAamp Spin Columns	250	QIAGEN GmbH (51106)
	Collection tubes (2ml)	750	
	Buffer AI	54 ml	
	Buffer AW1	95 ml	
	Buffer AW2	66 ml	
	Buffer AE	60 ml	
	QIAGEN [®] Protease	1 ampulle	
	Protease Solvent	5,5 ml	
QIAquick [®] Gel extraction kit (50)	QIAquick Spin Columns	50	QIAGEN GmbH (28704)
	Buffer QG	2 x 50 ml	
	Buffer PE	2 x 10 ml	
	Buffer EB	15 ml	
	Collection tubes (2ml)	50	
	Loading Dye	110µl	
	Håndbok	1	
Big Dye [®] 3.1 Cycle Sequencing Kit	Big Dye [®] 3.1	1x800 µl	Applied Biosystems (Sett for 100 reaksjoner: 4337455)
	Sekvenseringsbuffer	2x1 ml	
	pGEM kontroll DNA	1 rør	
	M13 (-21) Primer	1 rør	

LightCycler® 480 Genotyping Master	Ampulle med gul kork: modifisert Taq DNA polymerase, reaksjons buffer, dNTP mix (med dUTP istedenfor dTTP) og 15mM MgCl ₂	4 x 384 µl	Roche (04 707 524 001)
	Ampulle med blank kork: PCR rensed H ₂ O	4 x 1 ml	
	Ampulle med blå kork: 25 mM MgCl ₂ løsning	1 x 1 ml	
Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	Ampullene inneholder en løsning med: 22U/ml rekombinant Taq DNA polymerase, Pyrococcus species GB-D termostabil polymerase, Platinum® Taq antistoff, 66 med mer Tris-SO ₄ (pH8,9) , 19,8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,4 mM Mg SO ₄ , 220 µM dNTP mix og stabilisatorer	4 x 1,125 ml (100 reactions)	Invitrogen (12532-016)

Tabell 4.3.1 Liste over Kit

4.4 Kjemikalieliste

Kjemikalie	Leverandør (Katalog nr.)
Agarose, Type I	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (A6013-1006)
Bromphenol blue	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (263-653-2)
Ethidium Bromide	Gene choice a Pelican Life Sciences Company (5450)
Glycerol ca 87 %	Merck KGaA
Xylene cyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (x-0377)

Tabell 4.4.1 Kjemikalieliste

4.5 Markører

Markør	Leverandør navn	Leverandør (Katalog nr.)
DNA stige	Trackit TM 50 bp DNA ladder	Invitrogen (10488-043)

Tabell 4.5.1 Liste over markører

4.6 Oligonukleotider

Forkortelse	Leverandør navn	Nukleotid sekvens	Leverandør
UGT1A4S	rs6755571_S	5'-ggg ggc tca atg aca agg ta-3'	TIB Molbiol
UGT1A4R	rs6755571_R	5'-agt gta gcc cag cgt aac-3'	TIB Molbiol
UGT1A4F	rs6755571_F	5'-gat ttg cta ggt ggc tca at-3'	TIB Molbiol
UGT1A4A	rs6755571_A	5'-ttc tct tct ttg atg tgc ata ttc-3'	TIB Molbiol
UGT1A4S	00051511_7 DNA	5'-ggg ggc tca atg aca agg ta-3'	Biomers.Net GmbH
UGT1A4R	00051511_8 DNA	5'-agt gta gcc cag cgt aac-3'	Biomers.Net GmbH
UGT2B15F	rs1902023_F	5'-tgg ata aat atg aag aca atc ctg-3'	TIB Molbiol
UGT2B15S	rs1902023_S	5'-gtg act gtg ttg aca tct tcg-3'	TIB Molbiol
UGT2B15A	rs1902023_A	5'-aaa ctg cat ctt tac aga gct t-3'	TIB Molbiol
UGT2B15R	rs1902023_R	5'-ctt tga ctc tgg tag ttt cat cat aag-3'	TIB Molbiol
UGT2B15S	00051511_9 DNA	5'-gtg act gtg ttg aca tct tcg-3'	Biomers.Net GmbH
UGT2B15A	00051511_10 DNA	5'-aaa ctg cat ctt tac aga gct t-3'	Biomers.Net GmbH

Tabell 4.6.1 Liste over oligonukleotider (Primere)

4.7 Prober

Forkortelse	Leverandør navn	Nukleotid sekvens	Leverandør
UGT1A4 C	rs2011425_[C]	5'-cgc acg gcc tcc cgc a-FL -3'	TIB Molbiol
UGT1A4 Anc	rs2011425_Anc	5' - LC-gct gag cca ggg gct gcc atc agt g-p -3'	TIB Molbiol
UGT2B15 Anc	rs1902023_Anc	5'-cac cat ata tcc atc tat cga gaa ttt tca g-FL -3'	TIB Molbiol
UGT2B15 C	rs1902023_C	5' - LC-aga gaa tct tcc aaa tca ttt tta gt-p -3'	TIB Molbiol

Tabell 4.7.1 Liste over Prober

4.8 Utstysrliste

Utstyr	Bruksområde	Leverandør (Katalog nr.)
Biofuge Fresco Heraeus	Sentrifuge	Kendro Laboratory Products
Biofuge Pico Heraeus	Sentrifuge	Kendro Laboratory Products
Captair [®] bio	LAF benk	Erlab
Centrifuge 5804R	Sentrifuge for PCR brett	Eppendorf AG
EK-200G MFD	Vekt	A&D Co Ltd
Electrophoresis Power Supply- EPS 601	Strømforsyning ved elektroforese	Amersham Biosciences (18-1130-02)
Electrophoresis Power Supply- EPS 3500 XL	Strømforsyning ved elektroforese	Pharmacia Biotech
GeneAmp PCR System 2400	Vanlig PCR maskin	Perkin Elmer
GeneAmp [®] PCR System 9700	Vanlig PCR maskin	Applied Biosystems
Grant QBT1	Varmebløkk	Grant Instruments Ltd
Hofer HE 33	Mini elektroforese enhet	Amersham Biosciences (80-6052-45)
LightCycler [®] 480	Real time PCR maskin	Roche
Minispin plus	Sentrifuge	Eppendorf AG
Kodak DC 120 kamera	kamera	Eastman Kodak Company
TF 20M (312 nm)	UV lampe	Vilber Lourmat
Pipette 0,1-2,5 µl	Pipette	Eppendorf Research
Pipette 0,5-10 µl	Pipette	Eppendorf Research
Pipette 10-100 µl	Pipette	Eppendorf Research
Pipette 100-1000 µl	Pipette	Eppendorf Research
Spectrophotometer ND-1000	Spektrofotometer	Nanodrop Technologies Inc

Tabell 4.8.1 Liste over utstyr

4.9 Andre materialer

Materiale	Leverandør (Katalog nr.)
Eppendorfrør 1,5ml vanlig	Eppendorf AG
Eppendorfrør 1,5 ml safe lock	Eppendorf AG (0030 120 086)
KimCare [®] Medisinske kluter	Kimberly-Clark Europe Ltd
LightCycler [®] 480 Sealing foil	Roche (04 729 757 001)
LightCycler [®] 480 Multiwell Plate 96	Roche (04 729 692 001)
MicroAmp [™] 8-cap strip	Applied Biosystems (N801-0535)
MicroAMP [®] Reaction Tubes	Applied Biosystems (N801-0533)
PCR rene pippettespisser	Eppendorf AG (022 491 202)
PCR rene pippettespisser	Eppendorf AG (022 491 237)
PCR rene pippettespisser	Eppendorf AG (022 491 253)

Tabell 4.9.1 Liste over diverse materialer

5. Metoder

5.1 Rensing av genomisk DNA

Genomisk DNA (gDNA) ble rensset fra fullblod ved bruk av QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (250). Protokollen for rensing av gDNA fra fullblod er beskrevet i "QIAamp[®] DNA Mini Kit and QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit Handbook" fra QIAGEN. Gjennomsnittlig ble 12 prøver rensset samtidig, og i det følgende er rensing av en prøve beskrevet. Framgangsmåten ved rensing av gDNA fra fullblod ved hjelp av utstyrs pakken fra QIAGEN består av fire trinn [59]. I første trinn tilsettes 20 µl Proteinase K og deretter 200 µl romtemperert og homogen fullblod til et eppendorfrør. Etterpå tilsettes 200 µl med lysis buffer (AL) og prøven blandes godt med vortexing for å få en homogen løsning. Prøven settes så til inkubasjon i 10 min ved 56°C. I dette trinnet lyseres cellemembranen og andre membraner av Proteinase K kombinerte med at proteindegraderende kjemikalier i lysis bufferen bidrar til nedbrytning av proteiner. Dermed frigjøres DNA, samt komponenter som kan forurense sluttproduktet blir brutt ned. Sentrifuger prøven kjapt etter inkubasjon for å fjerne væskedråper på innsiden av lokket. Tilsett så 200 µl 96 % etanol og bland løsningen med vortexing. Sentrifuger prøven kjapt for å fjerne væskedråper på innsiden av lokket. Overfør prøven fra eppendorfrøret til en QIAamp Spinn kolonne. DNA vil nå binde til silica membranen og prøven sentrifugeres ved 8000 rpm (6000·g) i 1 min eller inntil all væsken har passert igjennom membranen. Overfør kolonnen til et ubrukt oppsamlingsrør og kast oppsamlingsrøret med væsken. Nå begynner tredje trinn i prosessen med å rense gDNA fra fullblod. Tilsett 500 µl Buffer AW1 og sentrifuger ved 8000rpm i 1 min. Overfør kolonnen til et nytt oppsamlingsrør og kast oppsamlingsrøret med vaskebufferen. Tilsett 500 µl buffer AW2 til kolonnen og sentrifuger ved maksimal hastighet (13000 rpm) i 3 min. Begge vaskebufferene inneholder etanol som bidrar til å fjerne biopolymerer som karbohydrater og RNA fra Silica membranen. Sammensetningen av de to vaskebufferene er ellers noe ulik og hensikten er at de til sammen skal fjerne mest mulig av proteiner, karbohydrater, RNA og andre komponenter som kan forurense det ferdig rensede DNA produktet. Overfør deretter kolonnen til et rent mikrosentrifuge rør (f.eks 1,5 ml eppendorfrør) og sentrifuger ved maksimal hastighet i 1 min for å bli kvitt alle rester av vaskebufferen. Før eluering av DNA overføres kolonnen til et rent og merket 1,5 ml eppendorfrør. Tilsett 200 µl med AE buffer og

sett den til inkubasjon i 5 min ved romtemperatur. Eventuelt kan 10 mM Tris·Cl brukes ved eluering for å redusere degradering av DNA ved lengre tids lagring. Sentrifuger ved 8000rpm i 1 min for å eluere DNA i AE buffer eller i 10 mM Tris·Cl. gDNA lagres ved -80 °C inntil bruk.

5.2 UV til synlig lys spektroskopi

Spectrophotometer ND-1000 med deteksjonsspektrum 220-750 nm og veilengde 0,02-0,1 cm ble brukt til å bestemme konsentrasjonen av gDNA og opprenset PCR produkt. Synlig lys og UV lys er elektromagnetisk stråling. Når elektromagnetisk stråling sendes igjennom en løsning kan enkelte bølgelengder bli absorbert. Et molekyl eller et stoff vil ha maksimal absorpsjon ved en eller flere bestemte bølgelengder. Graden av absorpsjon varierer med konsentrasjonen i løsningen. Beers lov gir sammenhengen mellom bølgelengde, absorpsjon og konsentrasjon [60].

$$\text{Beers lov: } A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Hvor A er absorpsjon, I er lysintensitet målt etter at den elektromagnetiske strålingen har passert prøven, I_0 er lysintensitet målt etter at den elektromagnetiske strålingen har passert en blank prøve, ε er molar absorpsjonskoeffisient med enhet liter/ mol·cm og c er konsentrasjonen i mol/liter.

Ved måling av DNA konsentrasjon med Spectrophotometer ND-1000 oppgis konsentrasjonen i ng/ μ l istedenfor i mol/liter. For å endre konsentrasjonsheten må en modifisert versjon av Beers lov benyttes. Den molare absorpsjonskoeffisienten ε med enhet liter/ mol·cm erstattes av en ekstinksjonskoeffisient med enhet ng·cm/ μ l. Innsetting av denne ekstinksjonskoeffisienten og manipulasjon av ligningen for å finne konsentrasjonen c gir formelen $c = \frac{A \cdot e}{l}$. Ekstinksjonskoeffisienten som blir brukt av Spectrophotometer ND-1000 for dobbeltrådet DNA er $e = 50 \text{ ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{l}$. Ved måling av DNA konsentrasjon på Spectrophotometer ND-1000 blir absorpsjonen målt ved 260 og 280 nm. Veilengden som benyttes er 0,1 cm eller 0,02 cm ved høye konsentrasjoner. DNA har maksimal absorpsjon

ved 260 nm mens mange proteiner og proteinrester som kan forurense prøven har maksimal absorpsjon ved 280 nm. Ratio av 260/280 gir en indikasjon på renheten til prøven. En ratio på 1,8 eller høyere blir regnet for å være en ren prøve ved måling av DNA konsentrasjon.

Ved måling av DNA konsentrasjon ble protokollen i Spectrophotometer ND-1000 User's Manual fra Nanodrop fulgt [61]. Før måling av DNA konsentrasjon rengjøres pidestallene med ddH₂O og KimCare[®] Medisinske kluter. Appliser 1,5 µl av væsken som er løsemiddel og foreta måling av absorpsjon. Denne målingen fungerer som referansen I₀. Rengjør pidestallene igjen og appliser 1,5 µl av prøven med DNA og mål absorbansen. Programvaren til Spectrophotometer ND-1000 beregner konsentrasjonen og oppgir absorbansen ved 260 og 280 nm samt ratio av 260/280.

5.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.3.1 Generelt om PCR

PCR ble brukt til å amplifisere UGT1A4 og UGT2B15 genene. Før en PCR reaksjon må det designes og syntetiseres oligonukleotider som kan fungere som primere for DNA syntese. Syntetiske oligonukleotider som skal fungere som primere i en PCR reaksjon må oppfylle de følgende kravene:

1. Oligonuklotidene må være komplementære til DNA sekvenser oppstrøms for 3' endene av den interessante DNA sekvensen.
2. Oligonuklotidene må binde spesifikt til områdene på flankene av det interessante genet. Binding til andre sekvenser i templatet må ikke forekomme.
3. Oligonuklotidene må ikke være komplementære til hverandre.
4. Styrken på bindingen mellom oligonuklotid og komplementær DNA sekvens må være justert slik at de to oligonuklotidene får mest mulig lik hybridiseringstemperatur.

5.3.2 Vanlig Polymerase Chain Reaction for UGT1A4 og UGT2B15

UGT1A4 og UGT2B15 ble amplifisert med vanlig PCR som et trinn i sekvenseringen av genene. To par med oligonuklotider ble designet og syntetisert av TiB Molbiol for hver av genene. Oligonukleotider syntetisert av Biomers ble også brukt (Se tabell 4.6). Før bruk ble oligonuklotidene løst i PCR rensset vann slik at konsentrasjonen ble 200 μM , fordelt på rør med 10 μl og lagret ved -20°C . Protokollen for PCR reaksjonen tar utgangspunkt i manualen til Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity [62]. Ved tillaging av reaksjons løsning ble det først laget en primermix. Primerparet ble fortynnet til 10 μM før bruk ved å blande 0,5 μl av hver primer med 9 μl PCR rensset H₂O. PCR reaksjonen ble kjørt i MicroAmp[®] Reaction Tubes. I et totalvolum på 50 μl ble det tilsatt 45 μl Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity, 1 μl Primermix (5 μM) og 4 μl gDNA templat (ca 35,2 ng/ μl). PCR reaksjonen ble hovedsakelig kjørt på GeneAmp[®] PCR System 9700, men i noen tilfeller ble GeneAmp PCR System 2400 benyttet. Protokollen for vanlig PCR med UGT1A4 er beskrevet i tabell 5.3.2.a Den optimale annealing temperaturen er 2^oC lavere ved vanlig PCR på de to ovenfor nevnte PCR maskinene enn ved Real time PCR på LightCycler[®] 480 for UGT1A4. Protokollen for vanlig PCR med UGT2B15 er beskrevet i tabell 5.3.2.b PCR reaksjonen starter med et ekstra denaturerings trinn på 94^oC i 2 min. Deretter begynner første trinn i PCR reaksjonen med et nytt denatureringstrinn på 94^oC i 30 sekunder. Oppvarmingen under denatureringen fører til at bindingene mellom de komplementære DNA trådene brytes og regionen som skal amplifiseres blir gjort tilgjengelig. Andre trinn i PCR reaksjonen er hybridisering ved 50^oC for UGT1A4 og ved 55^oC for UGT2B15. Temperaturreduksjonen gjør det mulig for de respektive primerene å binde til den komplementære DNA sekvensen i templatet. Hybridiseringstrinnet varer i begge tilfeller i 30 sekunder. Det tredje og siste trinnet er polymerisering der temperaturen økes til 68^oC i 30 sekunder. I løpet av polymeriseringstrinnet vil en polymerase bruke 3' enden av primeren som utgangspunkt for å feste deoxynuklotider og syntetisere en ny DNA tråd. Det er vanlig å benytte Taq polymerase eller en modifisert variant av denne som polymerase. Etter polymeriseringstrinnet vil de tre trinnene i PCR reaksjonen bli gjentatt 24 ganger slik at det blir 25 sykluser. Deretter følger et ekstra polymeriseringstrinn ved 68^oC i 7 minutter for å fullføre alle sekvenser. PCR produktet ble til slutt avkjølt til 4^oC

Program	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Denaturering	94 ⁰ C	2 min	1
Denaturering	94 ⁰ C	30 s	25
Hybridisering	50 ⁰ C	30 s	
Polymerisering	68 ⁰ C	30 s	
Polymerisering	68 ⁰ C	7 min	1
Avkjøling	4 ⁰ C	∞	-

Tabell 5.3.2.a Protokoll for vanlig PCR med UGT1A4

Program	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Denaturering	94 ⁰ C	2 min	1
Denaturering	94 ⁰ C	30 s	25
Hybridisering	55 ⁰ C	30 s	
Polymerisering	68 ⁰ C	30 s	
Polymerisering	68 ⁰ C	7 min	1
Avkjøling	4 ⁰ C	∞	-

Tabell 5.3.2.b Protokoll for vanlig PCR med UGT12B15

5.3.3 Generelt om Real time PCR

Real time PCR med hybridiserende prober er en metode for å kunne bestemme tilstedeværelse eller fravær av en kjent enkeltnukleotidpolymorfisme (Single nucleotide polymorphism, SNP) i gener. Det benyttes to fluoriserende prober som binder spesifikt over det området der enkeltnukleotidpolymorfismen befinner seg. Hver av probene har bundet til seg en fluorofor, der den ene er donor og den andre akseptor. Energi blir overført fra donor til akseptor vha FRET (Fluorescence resonance energy transfer) prinsippet. En lyskilde eksiterer donor fluoroforen som så emitterer energi og hvis akseptor fluoroforen befinner seg i nærheten vil den absorbere energien fra donor fluoroforen. Energien blir kun overført fra donor til akseptor dersom begge probene er bundet til PCR produktet. Akseptoren vil deretter sende ut et foton og dermed er det et fluorescens signal som kan måles

Smeltekurvsanalyse i etterkant av PCR reaksjonen ble brukt for å bestemme SNP status til DNA produktet [63]. Etter siste syklus i PCR reaksjonen økes temperaturen til over

90°C slik at DNA blir enkelttrådet. Deretter senkes temperaturen igjen til en temperatur som er optimalisert for polymerisering mellom de hybridiserende probene og PCR produktet. Til slutt økes temperaturen gradvis og bindingen mellom PCR produkt og probe brytes. Ved en temperatur T_M vil 50 % av probene ha dissosiert fra DNA tråden og denne temperaturen kalles smeltepunktstemperaturen. Fluorescensintensiteten vil endre seg parallelt med binding og etterfølgende dissosiasjon mellom enkelttrådet DNA og probene. Endringen av fluorescens intensitet vises som en funksjon $f(T)$ av temperaturen i et x-y diagram. Den deriverte $-f'(T)$ vises i et annet x-y diagram og toppene til den deriverte tilsvarer T_M . Bindingsstyrken mellom proben og DNA bestemmer T_M og bindingsstyrken er størst når de to sekvensene er fullstendig komplementære. Vanligvis er proben designet slik at den er fullstendig komplementær til en DNA tråd uten enkeltnukleotidpolymorfisme. Bindingsstyrken vil da være lavere når DNA tråden har en enkeltnukleotidpolymorfisme. Siden bindingsstyrken og dermed T_M vil variere avhengig av SNP status til DNA tråden vil plasseringen av toppene til den deriverte $-f'(T)$ variere med SNP status. Forskjellig plassering av toppene for den deriverte kan derfor brukes til å bestemme SNP status til en prøve.

5.3.4 Real time PCR med UGT1A4

Ved real time PCR ble LightCycler[®] 480 fra Roche brukt. Protokollen for real time PCR er basert på protokollen for LightCycler[®] 480 Genotyping Master [64] og manualen for LightCycler[®] 480 [65]. Ved kjøring av real time PCR ble 17,5 µl mastermix og 2,5 µl gDNA tilsatt per brønn på et 96 brønners Brett. Før PCR reaksjonen ble brettene forseglett med folie og sentrifugert ved 4°C med 3000 rpm i 2 minutter på Centrifuge 5804 R. Først lages en primermix der konsentrasjonen er 10 µM av UGT1A4S og 5 µM av UGT1A4R. Deretter lages en probemix med sluttkonsentrasjon 4 µM av hver probe For hver brønn med et totalvolum på 20 µl tilsettes 11,5 µl PCR rensed H₂O, 1,0 µl Probemix (2,5 µM), 1,0 µl Primermix (0,5 µM for UGT1A4S og 0,25 µM for UGT1A4R) , 4,0 µl LC[®] genotyping Master og 2,5 µl gDNA (ca 35,2 ng/ µl) . Løsningene blandes ved å pipettere opp og ned og til slutt sentrifugeres løsningen raskt. Resultatet er en homogen mastermix der hele væskevolumet er samlet i bunnen av eppendorfrøret.

Protokollen for real time PCR med UGT1A4 består av fire hovedprogrammer; preinkubasjon, amplifikasjon, smeltekurveanalyse og avkjøling. En komplett liste over alle

brukte parametre er vist i Tabell 5.3.4.a Under preinkubasjon blir temperaturen økt til 95°C i 10 minutter for å separere DNA trådene og aktivere polymerasen. Amplifikasjonsprogrammet inneholder de tre trinnene i en PCR reaksjon. I første trinn økes temperaturen til 95°C i 10 sekunder for denaturering av DNA. I andre trinn blir temperaturen senket til 52°C og både primerene og probene vil hybridisere til sine komplementære sekvenser i DNA. Proben med donor fluoroforen vil binde i nærheten av sekvensen hvor proben med akseptor fluoroforen binder, og den resulterende fluorescensen fra akseptor fluoroforen vil så bli detektert av instrumentet. I tredje trinn økes temperaturen til 72°C og i løpet av polymeriseringsprosessen vil probene dissosiere fra DNA tråden. Ved dissosiasjon vil fluorescensen fra akseptor fluoroforen opphøre siden den ikke lenger kan få overført den nødvendige energien fra donor fluoroforen. Etter hvert som mengden DNA produkt øker kan flere prober binde til en DNA tråd og fluorescensintensiteten vil øke. Siden fluorescensen blir detektert kontinuerlig kan dette brukes til å overvåke hvor langt PCR reaksjonen har kommet og hvor mye produkt som er produsert. Amplifikasjonsprogrammet har 45 sykluser og blir etterfulgt av programmet for smeltekurveanalyse som består av tre trinn. Først blir temperaturen økt til 95°C i 1 minutt for å få dissosiasjon av dobbeltrådet DNA slik at de aktuelle DNA sekvensene blir tilgjengelige for probene. Temperaturen blir så senket til 40°C og probene kan hybridisere med sine komplementære sekvenser. Så økes temperaturen gradvis opp mot 75°C slik at probene igjen vil dissosiere fra DNA tråden. Dermed vil fluorescensintensiteten raskt øke mot et maksimum for så å avta gradvis og til slutt flate ut. Målingen av fluorescens under smeltekurveprogrammet blir i ettertid brukt under smeltekurveanalyse til å bestemme SNP-status for prøvene. Til slutt i real time PCR reaksjonen er et avkjølingsprogram der temperaturen blir senket til 40°C i løpet av 30 sekunder.

Hoved-program	Del-program	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Preinkubasjon	Denaturering	95 ⁰ C	10 min	1
Amplifikasjon	Denaturering	95 ⁰ C	10 s	45
	Hybridisering	52 ⁰ C	10 s	
	Polymerisering	72 ⁰ C	15 s	
Smeltekurve-analyse	Denaturering	95 ⁰ C	1 min	1
	Probe-hybridisering	40 ⁰ C	1 min	
	Probe-denaturering	75 ⁰ C	(Ikke spesifisert)	
Avkjøling	Avkjøling	40 ⁰ C	∞	-

Tabell 5.3.4.a Protokoll for vanlig real time PCR med UGT1A4

5.4 Agarose gel elektroforese

PCR produkt av UGT1A4 og UGT2B15 ble kjørt på agarose gel for å separere PCR produkt fra andre komponenter i PCR reaksjonen før sekvensering. Til elektroforese ble det brukt 60 ml 2 % agarose geler siden den agarose konsentrasjonen er velegnet til å separere PCR produkt med lengde 0,1-3 kb. I det følgende er tillaging av agarose gel og preparering av PCR produkt beskrevet. Til en 250 ml erlenmeyer kolbe ble det tilsatt 60 ml 1xTAE buffer og 1,2g agarose type I. Løsningen skal så varmes opp inntil agarosen er fullstendig oppløst. Deretter må løsningen avkjøles til ca 50⁰C for at plastformen til gelen ikke skal smelte. Så ble 1,2 µl Etidium Bromid (1,25 % vekt/ volum) tilsatt og blandet med løsningen. Den flytende løsningen ble så overført til en støpeform for 60 ml geler tilsatt en brønmal. Etter ca en halv time har gelen strøknet, og brønmalen fjernes forsiktig og gelen overføres til en Hoefer HE 33 beholder for gel elektroforese. Det tilsettes så 1xTAE buffer inntil gelen er dekket av buffer. For å forberede PCR produktet til elektroforese overføres 40 µl PCR produkt til et eppendorfrør og det tilsettes 8 µl "Loading Buffer". "Loading Buffer" inneholder glycerol som tynger ned løsningen og gjør at løsningen vil synke til bunns i brønnene når prøvene overføres til gelen. I tillegg inneholder "Loading Buffer" to fargestoffer (bromfenol blått og xylene cyanol (gult)) som gjør det lettere å se prøven ved overføring til gel og de fungerer som markører på vandringsfronten ved elektroforese. Før overføring av prøven til gel må løsningen av "Loading Buffer" og PCR produkt blandes grundig. Til en av brønnene i gelen

tilsettes 5 μ l standard (50 bp DNA stige) og i de andre brønnene tilsettes 35 μ l av prøvene. Ved kjøring av elektroforese brukes EPS 601 Electrophoresis Power Supply for å skape den nødvendige spenningen over gelen. Protokollen for elektroforesen tar utgangspunkt i manualen for enheten og parameterene var satt til 95V, 150 mA og 100W i to timer. Siden DNA er negativt ladet vil DNA fragmentene vandre fra den negative anoden mot den positive katoden. Separasjon av DNA fragmentene skjer på grunnlag av forskjell i størrelse på fragmentene. Små fragmenter passerer porene i gelen lettere enn store fragmenter og små fragmenter vandrer derfor lengre enn store. Sammenligning med en standard med fragmenter av kjent størrelse brukes så til å bestemme størrelsen på DNA fragmentene i PCR produktet.

5.5 Ekstraksjon av PCR produkt fra agarose gel

Til ekstraksjon ble det brukt QIA quick Gel extraction Kit. I det følgende framgangsmåte for ekstraksjon av ett PCR produkt beskrevet basert på protokoll fra QIAGEN [66]. Skalpell ble brukt til å kutte ut en gelbit med PCR produkt. Gelbiten ble overført til et eppendorfrør og vekten av gelbiten ble bestemt. Per volum gel skal det tilsettes 3 volum med QG Buffer. Den øvre grensen for størrelsen av en gelbit er 400 mg. Massetettheten av gelen er tilnærmet lik 1 mg / μ l slik at til f.eks 100 mg gel skal det tilsettes 300 μ l QG Buffer. Tilsetting av QG Buffer bidrar til å løse opp gelen. I tillegg vil QG Buffer regulere saltkonsentrasjonen og pH til løsningen på en måte som er optimal for binding av DNA til Silica membranen. Eppendorfrøret ble så satt til inkubasjon i 10 min ved 50°C. Hensikten med oppvarmingen er å få gelen til å smelte slik at DNA vil befinne seg i en homogen løsning. For å få løsningen til å bli homogen kan røret vortexes hvert tredje minutt i løpet av inkubasjonstiden. Fargen til løsningen må kontrolleres etter inkubasjonen. QG Buffer inneholder en indikator som gir løsningen en gul farge ved $\text{pH} \leq 7,5$. Dersom pH til løsningen overstiger 7,5 skifter fargen til oransje eller fiolett. Ved $\text{pH} \geq 7,5$ vil graden av DNA adsorpsjon til Silica membranen bli redusert. Ved fargeskifte fra gul til oransje eller fiolett bør det derfor tilsettes en liten mengde 3 M Natrium acetat med pH 5,0 inntil løsningen igjen blir gul. Det vil senke $\text{pH} \leq 7,5$ og DNA adsorpsjonen til Silica membranen vil øke. Etter at fargen til løsningen er kontrollert og løsningen eventuelt er blitt pH justert skal det tilsettes ett volum isopropanol per volum agarose gel. Tilsetting av isopropanol vil øke utbyttet av DNA fragmenter som er kortere enn 500 bp eller lengre en 4 kb. For DNA

fragmenter som er mellom 500 bp og 4 kb har tilsetning av isopropanol ingen betydning for utbyttet. Deretter overføres løsningen til en QIAquick spin kolonne som er plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. En QIAquick kolonne kan fylles med inntil 800 µl væske. Dersom det totale volumet overstiger 800 µl må det foretas flere trinn med overføring av væske og sentrifugering. Kolonnen ble så spunnet ved 13000 rpm i 1 min for å få DNA til å binde til Silica membranen. Etter sentrifugering tømmes oppsamlingsrøret for væske før kolonnen plasseres tilbake i det samme oppsamlingsrøret. For å fjerne alle agarose rester tilsettes det 500 µl QG Buffer til kolonnen som så sentrifugeres igjen i 1 min ved 13000 rpm. Den oppsamlede væsken fjernes fra oppsamlingsrøret før neste trinn. Deretter følger et vasketrinn hvor det tilsettes 750 µl PE buffer. Kolonnen sentrifugeres i 1 min ved 13000 rpm og den oppsamlede væsken tømmes ut. For å fjerne mest mulig av væsken fra Silica membranen og kolonnen sentrifugeres kolonnen en gang til ved 13000 rpm i 1 min. Vasking med PE buffer fjerner urenheter som salter, agarose, fargestoffer, EtidiumBromid og andre stoffer fra løsningen som ble applisert på kolonnen. Til slutt overføres kolonnen til ett tomt 1,5 ml eppendorfrør. For å eluere DNA fra Silica membranen tilsettes 30 µl tynn TE buffer til sentrum av Silica membranen. Etter tilsetning av tynn TE buffer skal kolonnen stå i 1 min før den sentrifugeres i 1 min ved 13000 rpm. Inkubasjonstiden på 1 min fører til at utbyttet av DNA øker.

5.6 Sekvenseringsreaksjon med PCR

Sekvensering av UGT1A4 og UGT2B15 ble analysert ved Sekvenslaboratoriet, Universitetet i Bergen. I forkant av sekvensering ble det utført PCR reaksjon med Big Dye versjon 3.1. Protokollen for reaksjonen er basert på standard protokollen til Sekvenslaboratoriet [67]. I det følgende er en sekvenseringsreaksjon for en prøve med en parallell av hver DNA tråd beskrevet. Først lages det en fortykning av hver primer der 0,5 µl 200 µM primer overføres til et eppendorfrør med 19,5 µl PCR rensed H₂O. For å få en homogen løsning må det blandes godt og sluttkonsentrasjonen blir 5 µM. Den samme prosedyren brukes for begge primerene. Til PCR reaksjonen ble det brukt MicroAmp[®] Reaction Tubes og reaksjonen ble kjørt på GeneAmp[®] PCR System 9700. Til hvert reaksjonsrør ble det tilsatt 4,0 µl PCR rensed H₂O 1,0 µl Big Dye 3.1, 1 µl av den ene

primeren (0,5 μ M) og 3 μ l rensert PCR produkt (ca 7,3 ng/ μ l). Totalvolumet blir 10,0 μ l. En slik PCR reaksjon har enkelttrådet DNA som sluttprodukt. Derfor må det settes opp to reaksjoner for hver prøve for å få sekvensen til to komplementære enkelttråder av DNA. Programmet for reaksjonen begynner med et pre denaturerings trinn ved 96°C i 5 minutter. Deretter er det 35 sykluser med amplifikasjon der hver syklus er delt inn i tre trinn. Først kommer denaturering ved 96°C i 10 sekunder, etterfulgt av hybridisering ved 50°C i 5 sekunder og til slutt polymerisering i 4 minutter. Etter siste syklus av amplifikasjonen blir rørene avkjølt til 4°C. Deretter tilsettes 10 μ l PCR rensert H₂O til hver prøve før levering til sekvenslaboratiet.

Reaksjonsmixen til sekvenseringsreaksjonen inneholder både deoxynukleotider og dideoxynukleotider. Polymeriseringsreaksjonen vil stoppe opp hver gang en dideoxynukleotid blir satt inn i DNA tråden som blir syntetisert. Det gir DNA tråder av variabel lengde. De 4 forskjellige dideoxynukleotidene er merket med hver sine fluorokromer og dermed er det mulig å identifisere hvilken dideoxynukleotid som ble satt inn til slutt. DNA trådene separeres på grunnlag av lengde på en denaturerende polyacrylamid gel og fluorescens blir brukt til å identifisere fluorokromene og de tilhørende dideoxynukleotidene. Programvaren til instrumentet vil deretter kombinere informasjonen om fluorescens, fluorokrom – dideoxynukleotid kombinasjon og lengde av DNA trådene og presentere resultatet som en DNA sekvens. Sekvenseringsreaksjonene ble analysert på ABI3730xl (Applied Biosystems).

5.7 Statistiske analyser

Til beregninger av de statistiske analysene ble programpakken SPSS 15.0 brukt. Serum konsentrasjonene av tamoxifen og metabolitter ble ln transformert for å normalisere fordelingen. Pasientprøvene ble delt inn i tre grupper for UGT1A4 genotype. De tre gruppene er homozygote for UGT1A4*3 allelen (Vt/Vt), heterozygote med UGT1A4*3 og UGT1A4*1 allelen (Wt/Vt) og homozygote for UGT1A4*1 allelen (Wt/Wt). Det ble brukt logistisk regresjon med justering for alder for å undersøke om det er noen sammenheng mellom UGT1A4 genotype og serum konsentrasjon av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, NDDTAM og 4OHNDTAM. Det ble brukt en tosidig test for å vurdere om det var noen statistisk signifikante forskjeller mellom de tre gruppene. Det ble beregnet

Hardy-Weinberg likevekt for distribusjonen av UGT1A4 allelene i utvalget. χ^2 test ble brukt til å sammenligne distribusjonen av genotyper i utvalget med tidligere studier.

6. Resultater

6.1 Real time PCR

6.1.1 Etablering av Real time PCR metode for UGT1A4

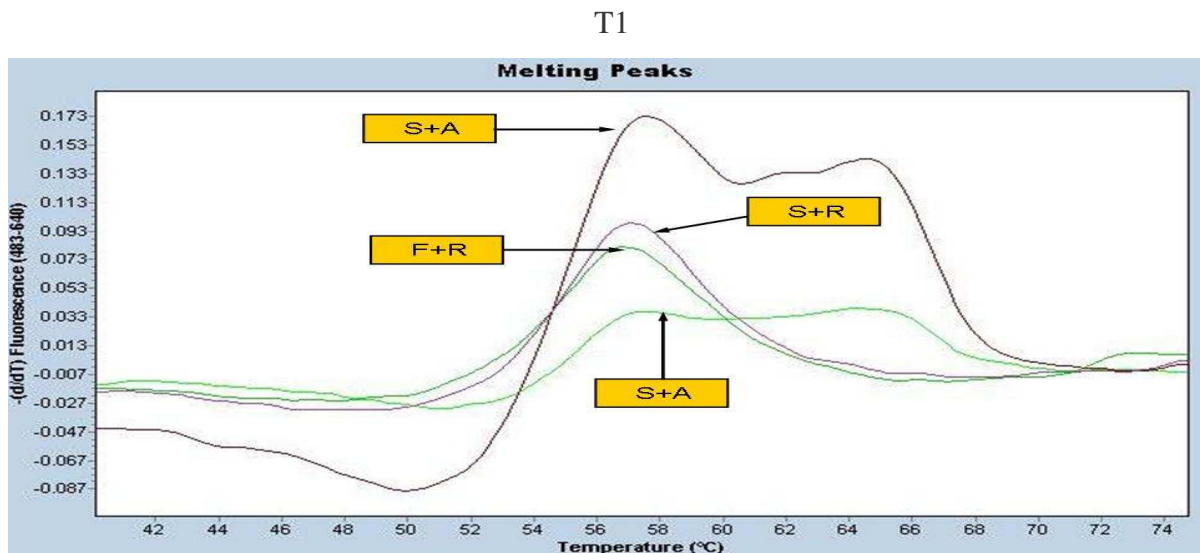
Primere og prober til bruk ved PCR og real time PCR ble designet og syntetisert av TiBMolbiol. Det ble designet to forward og to revers primere som binder til fire separate sekvenser i UGT1A4 genot. Det ble brukt et system med hybridiserende prober slik at fluorescens kun oppstår når de to probene har hybridisert på DNA tråden i nærheten av hverandre. Den ene proben som kalles UGT1A4_C dekker området med den interessante enkelt nukleotid polymorfismen i UGT1A4 (142 T > G). Proben er designet slik at den har en sekvens som er fullstendig komplementær til et område i genot som inneholder polymorfismen (G). Siden bindingsstyrken mellom proben og DNA sekvensen bestemmer smeltepunktstemperaturen T_M for proben vil T_M være høyest når proben binder til en DNA tråd som inneholder polymorfismen.

Før kjøring med real time PCR ble konsentrasjonen av gDNA målt med Spectrophotometer ND-1000. Gjennomsnittlig konsentrasjon av gDNA var 35,2 ng/ μ l og den lave 260/280 ratioen viste at prøvene har et lavt innhold av proteinrester og andre forurensende elementer.

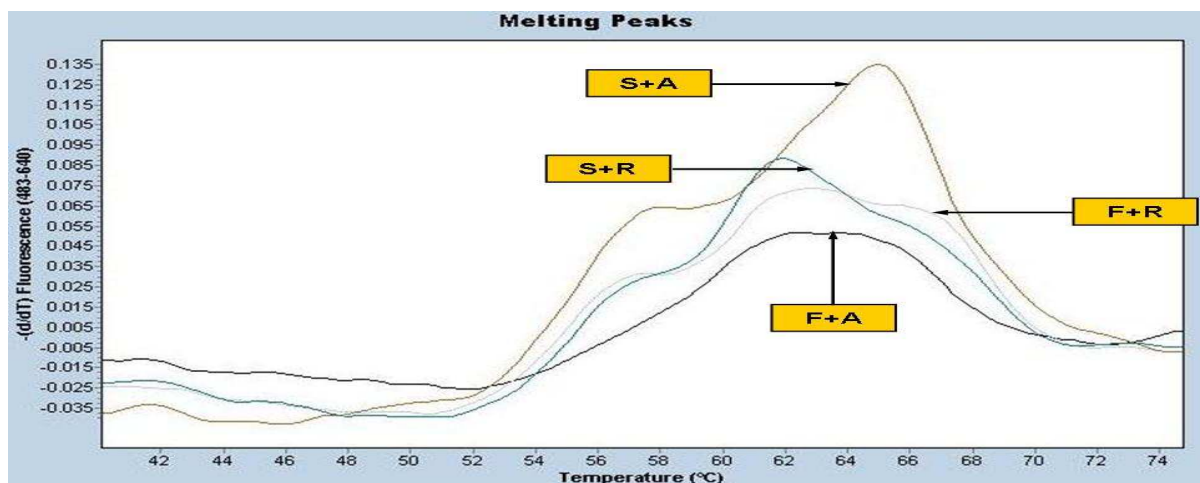
Ved første real time PCR kjøring ble de fire mulige primerkombinasjonene forsøkt på fire forskjellige pasientprøver. Det ble laget en mastermix for hver av de fire primerkombinasjonene F+A, F+R, S+A og S+R som inneholder 0,2 μ M av hver probe, 0,5 μ M av hver primer, LC[®] Genotyping Master og 5 μ l gDNA (ca 35,2 ng/ μ l) i et totalvolum på 20 μ l. Hybridiseringstemperaturen ble satt til 50°C, som er noe lavere enn den beregnede smeltepunktstemperaturen for samtlige primere. Resultatene etter smeltekurveanalyse var klart forskjellige avhengig av hvilken primerkombinasjon som var brukt for to av prøvene mens for de to andre prøvene var smeltekurvanlysene mer like. Pasientprøvene T22 og T1 gav en topp ved ca 57°C med primerkombinasjonen F+R og S+R mens primerkombinasjonen S+A og F+A gav to topper, ved ca 57°C og 65 °C. Dermed så det ut til at de to revers primerene gav forskjellig resultat mens forward primerene gav samme resultat. Figur 6.1.1.a

viser de to forskjellige type resultater fra real time PCR kjøringen. Smeltekurveanalysen for T1 og T21 viser at det for T1 er forskjellige resultat med de to reversprimerene mens det for T21 er et mer uklart resultat. Smeltekurveanalysen for de to andre prøvene er ikke vist, men T22 hadde tilsvarende resultat som T1 og T4 hadde tilvarende resultat som T2

A



B

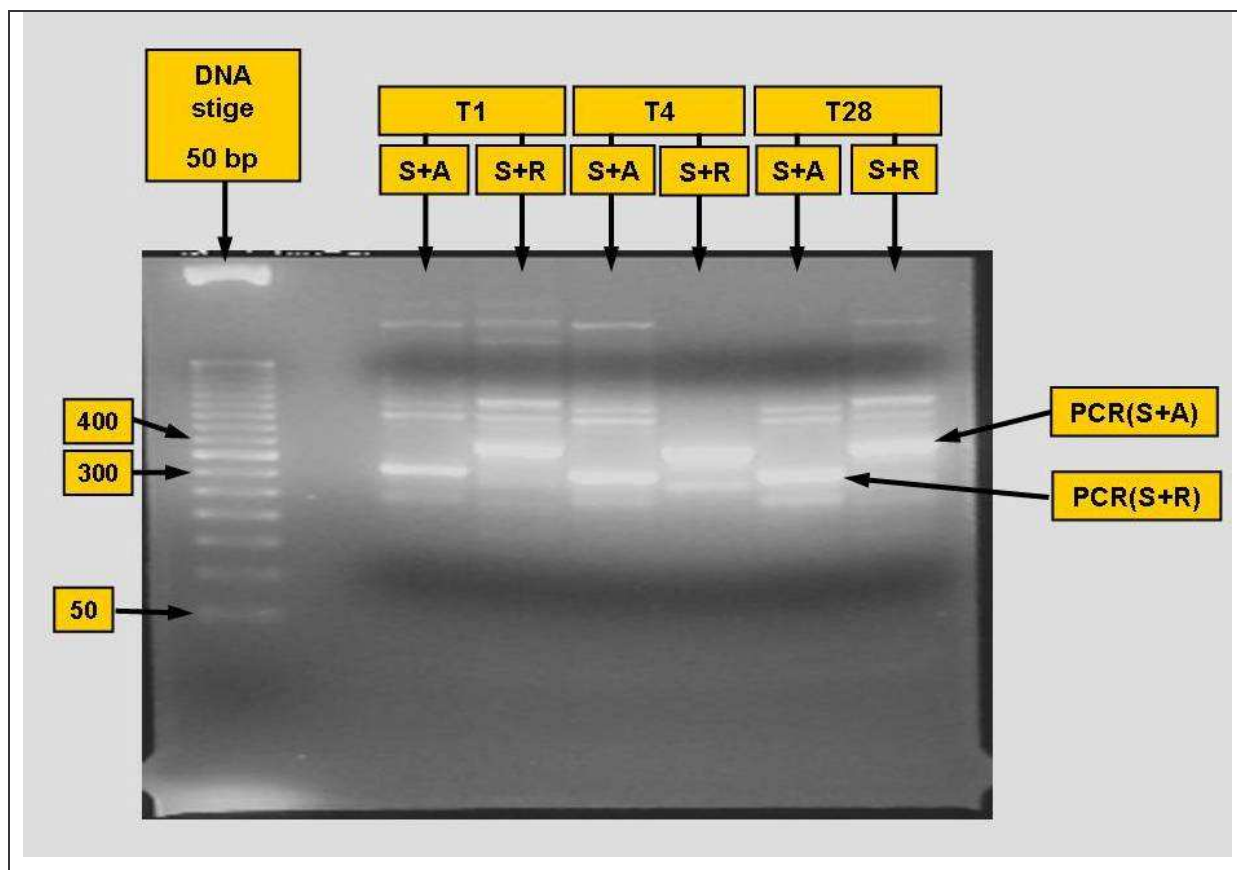


Figur 6.1.1.a Smeltekurveanalyse for T1 og T21

Real-time PCR fulgt av smeltekurveanalyse ble kjørt på UGT1A4 genet med fire forskjellige primerkombinasjoner (S+A, S+R, F+A og F+R) og hybridiseringsprober komplementær til variantallelen 142 T > G på pasientprøvene T1 (A) og T21 (B).

Siden forward primeren F viste seg å ikke være så bra, ble primerparene S+A og S+R valgt til videre innkjøring. Konsentrasjonen av S ble satt til det dobbelte av A og R for å sikre at det ble syntetisert tilstrekkelige mengder av DNA tråden som probene binder til og dermed unngå hook-effekt. En hook effekt er en reduksjon i fluorescensen etter at et platånivå for

amplifikasjon av den aktuelle DNA sekvensen er oppnådd. hook effekten skyldes at reaksjonsløsningen inneholder for små mengder av primeren som brukes ved syntese av den DNA tråden som proben hybridiserer med. Derfor vil økt konsentrasjon av den aktuelle primeren motvirke en hook effekt. Til hver prøve ble det tilsatt 0,2 μM av hver probe, 0,5 μM av primer S og 0,25 μM av primerene A eller R, LC[®] Genotyping Master og 2,5 μl gDNA (ca 35,2 ng/ μl) i et totalvolum på 20 μl . Hybridiseringstemperaturen ble økt med 2 $^{\circ}\text{C}$ til 52 $^{\circ}\text{C}$ for å øke spesifisiteten til PCR-kjøringen. Smeltekurveanalysen gav samme resultat som ved første kjøring. Den ene reversprimeren R gav en topp ved ca 57 $^{\circ}\text{C}$ mens den andre reversprimeren A gav to topper ved ca 57 $^{\circ}\text{C}$ og ca 65 $^{\circ}\text{C}$. For å undersøke om PCR reaksjonen hadde laget et PCR-produkt av rett størrelse, ble PCR produktet separert på 2 % agarose gel. Separasjon på agarose gel viste at størrelsen på PCR produktet med primerparet S+A var ca 300 bp og mellom 350 og 400 bp med primerparet S+R, som stemmer overens med forventet kalkulert størrelser på 311 og 367 bp for S+A og S+R, respektivt. Gelen viser også et sterkt og tydelig uspesifikt bånd ved ca 400 bp og et svakere og mindre tydelig uspesifikt bånd ved ca 300 bp for primerkombinasjonen S+R. De andre båndene som synes er primere som har hybridisert og DNA sekvenser som prober bundet til seg og derfor får endret vandre lengde igjennom gelen.



Figur 6.1.1.b Separasjon av PCR produkt på 2 % agarose gel

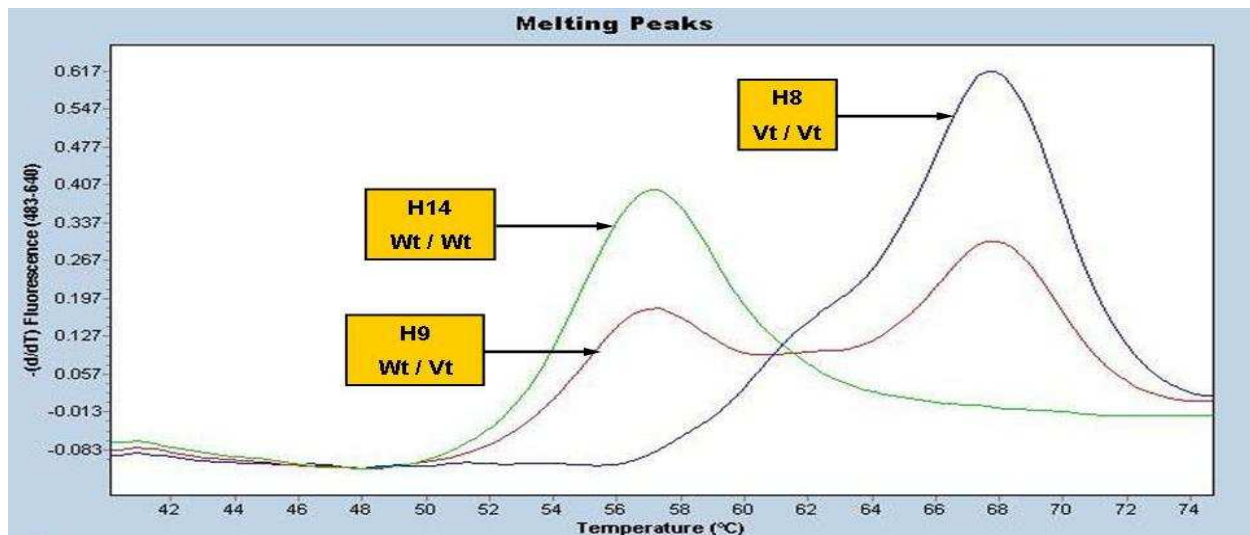
PCR produkt ble separert på 2 % agarose gel. DNA er gjort synlig ved hjelp av EtBr og UV fotografering. I brønn 1 er det en DNA stige med 50bp intervall, brønn 2 og 3 inneholder PCR produkt fra pasientprøve T1 med henholdsvis primerpar S+A og S+R, brønn 4 og 5 inneholder PCR produkt fra pasientprøve T4 med henholdsvis primerparene S+A og S+R, og brønn 5 og 6 inneholder PCR produkt fra pasientprøve T28 med henholdsvis primerparene S+A og S+R. Spesifikke PCR produkt er indikert med piler på høyre side.

De spesifikke PCR produktene ble kuttet ut fra gelen, og deretter ekstrahert fra gelen med QIA quick Gel extraction Kit. Etterpå ble det satt opp en sekvenseringsreaksjon for alle primerene som var brukt under kjøringen med real time PCR. Sekvensene fra reaksjonen viste at det var doble sekvenser ved bruk av primerkombinasjonen S+A (resultater ikke vist). For å undersøke hvilke andre gener primerkombinasjonen S+A kunne binde til og amplifisere, ble hele sekvensen for PCR produktet for UGT1A4 blastet mot genomisk bibliotek (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Det viste seg da at forward primer S og revers primer A hybridiserte, i tillegg til UGT1A4, også til UGT1A10 gen som naturlig inneholder G istedenfor T ved den tilsvarende plasseringen i gen som hos allele varianten UGT1A4*3b. Primerkombinasjonen S+R var spesifikk for UGT1A4. Derfor viser smeltekurvsanalysen to topper ved bruk av primerkombinasjonen S+A. Siden smeltekurvsanalysen ved bruk av S+R

kun inneholdt en topp tyder det på at de undersøkte prøvene er homozygote for en genvariant enten uten eller med polymorfismen. Undersøkelse av sekvensene for prøvene der S+R var brukt viste at de var homozygote for den vanlige varianten av UGT1A4 genotyper uten polymorfismen (resultater ikke vist). Dermed representerer en topp ved ca 57 °C i smeltekurvsanalysen av UGT1A4 ved bruk av S+R at prøven er homozygot for den vanlige (UGT1A4*1) varianten av genotyper. Forutsatt at de hybridiserende probene og smeltkurveanalyse vil gi tilsvarende resultater ved real time PCR med UGT1A4 som ved tilsvarende analyser av andre gener [63] kan den ovenfor beskrevne real time PCR metoden brukes til å bestemme allele type av UGT1A4 genotyper med hensyn på polymorfismen 142(T>G).

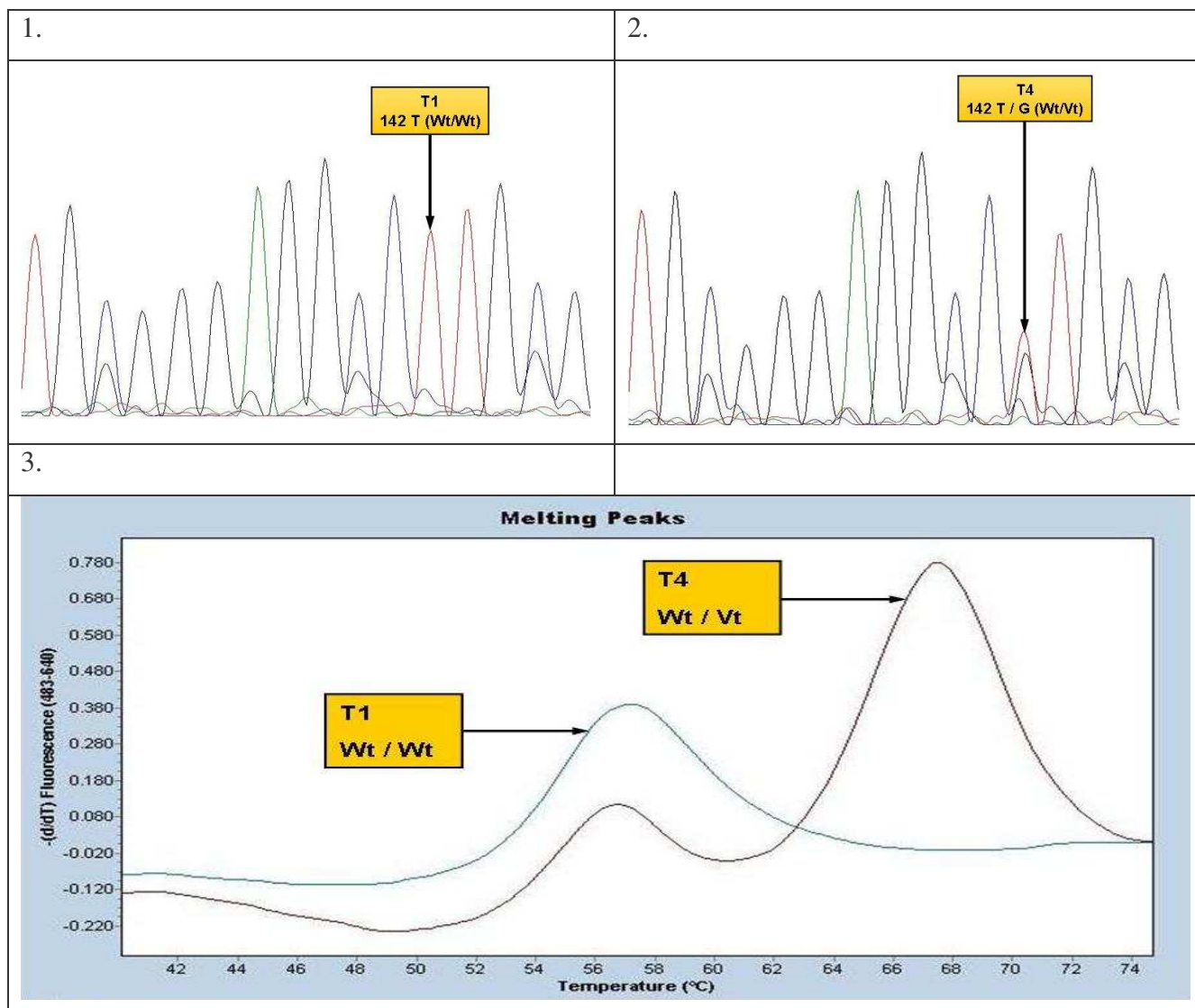
6.1.2 Identifikasjon av UGT1A4 genotype

Etter etablering av real time PCR metoden for UGT1A4 ble alle de 182 prøvene i materialet undersøkt ved hjelp av real time PCR for å bestemme allele type i forhold til 142(T>G) polymorfismen. Oppsettet ved kjøringene med UGT1A4 er beskrevet i metode delen og er identisk med det siste oppsettet som ble brukt med primerpar S+A under etablering av metoden. Smeltekurveanalysene for kjøringene med UGT1A4 gav tre forskjellige resultat. Et resultat var en topp ved ca 57°C, et annet resultat er to topper en ved ca 57°C og en ved ca 67°C og det tredje resultat alternativet er en topp ved ca 67°C. Figur 6.1.2.a viser de tre forskjellige typene resultat fra real time PCR kjøringen med UGT1A4. Smeltekurven til H8 har en topp ved ca 67 °C og det betyr at pasientprøven er homozygot for UGT1A4*3 allelen (Vt /Vt). H9 har to topper i smeltekurven. En ved ca 57 °C og en ved ca 67 °C og dermed er pasientprøven heterozygot med både UGT1A4*1 og UGT1A4*3 allelen (Wt / Vt). Smeltekurven til H14 har en topp ved ca 57 °C og dermed er pasientprøven homozygot for UGT1A4*1 allelen (Wt / Wt)



Figur 6.1.2.a Smeltekurveanalyse av UGT1A4 gen for pasientprøvene H8, H9 og H14 Smeltekurveanalysen av UGT1A4 gen for de tre pasientprøvene H8, H9 og H14 viser de tre mulige resultatene, som er homozygot for UGT1A4*1 (Wt / Wt), heterozygot med både UGT1A4*1 og UGT1A4*3 allelen (Wt / Vt) og homozygot for UGT1A4*3 allelen (Vt / Vt).

For å kvalitetssikre tolkningen av resultatene ble det utført sekvensering av en prøve med en enkelt smeltepunktstemperatur ved ca 57°C og tilsvarende av en prøve med to smeltepunktstemperaturer en ved ca 57°C og en ved ca 67°C. Resultatene fra sekvenseringene viste at det for prøven med en smeltepunktstemperatur var en enkelt sekvens av UGT1A4*1 allelen. For prøven med to topper var det dobbelt sekvens slik at både UGT1A4*1 og UGT1A4*3 (allele med enkelt nukleotidpolymorfisme) var representert. Figur 6.1.1.b viser sekvenseringsresultat og smeltekurveanalyse ved real time PCR for T1 og T4. Bilde 1 viser at T1 er homozygot for UGT1A4*1 (Wt) siden det kun er utslag for Thymin i posisjon 142. Bilde 2 viser at T4 er heterozygot med både UGT1A4*1 (Wt) og UGT1A4*3 (Vt) allele siden det er utslag for Thymin og Guanin i posisjon 142. Bilde 3 viser at smeltekurveanalyse for T1 gir T_M ved ca 57°C, mens for T4 gir smeltekurveanalyse ved ca 57°C og ved ca 67°C. Sammenligning av resultatene viser at T_M ved ca 57°C innebærer at pasientprøven har en UGT1A4*1 (Wt) allele, mens T_M ved ca 67°C innebærer at pasientprøven har en UGT1A4*3 (Vt) allele. Dermed er det vist overensstemmelse mellom resultatet fra real time PCR og sekvensering.



Figur 6.1.1.b Sekvensering og Real time PCR for pasientprøvene T1 og T4

Bilde 1 og 2: Sekvensering av T1 og T4 ble utført ved PCR amplifikasjon og analyse ved Sekvenslaboratoriet, UiB. I kromatogrammene for sekvenseringsreaksjonen er følgende fargekode brukt: grønn står for Adenin (A), blå står for Cytosin (C), svart står for Guanin (G) og rød står for Thymin (T). Bilde 3: Smeltekurveanalyse for T1 og T4 med primerene S+R

Resultatet fra bestemmelsen av UGT1A4 genotype med Real time PCR er vist i tabell 6.1.2.a. I utvalget på 182 pasienter er 87,91 % homozygote for UGT1A4*1, 11,54 % er heterozygote med UGT1A4*1 og UGT1A4*3 allele og 0,55 % (1 pasientprøve) er homozygot for UGT1A4*3. Distribusjonen av UGT1A4 genotyper i utvalget er i Hardy-Weinberg likevekt.

Allele type	Predikert genotype	Antall	Prosent andel av totalen
UGT1A4*3 / UGT1A4*3	Vt / Vt	1	0,55
UGT1A4*1 / UGT1A4*3	Wt / Vt	21	11,54
UGT1A4*1 / UGT1A4*1	Wt / Wt	160	87,91
Sum	-	182	100

Tabell 6.1.2.a Fordeling av UGT1A4 allele typer i utvalget. Forklaring av forkortelser: Vill type (Wt fra engelsk Wild type), Variant type (Vt fra engelsk Variant type).

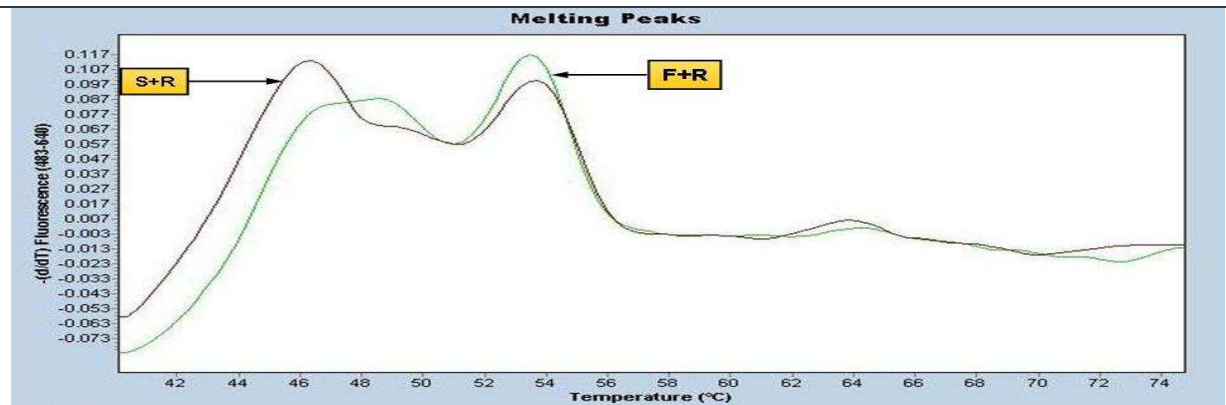
6.1.3 Forsøk på etablering av Real time PCR metode for UGT2B15

TiBMolbiol har designet og syntetisert to forward og to revers primere, og to prober til innkjøring av en real time PCR metode for UGT2B15. Proben UGT2B15 C dekker området med enkelt nukleotidpolymorfismen 253 G>T med allele navn UGT2B15*2. Probesequensen er fullstendig komplementær til den enkelttrådede sekvensen uten polymorfismen (UGT2B15*1). Bindingsstyrken mellom proben og DNA sekvensen vil da være større med et gen uten polymorfismen enn med et gen som inneholder polymorfismen. Siden bindingsstyrken påvirker smeltepunktstemperaturen T_M er det forventet at smeltepunktstemperaturen vil være høyere ved den vanligst forekommende allelen UGT2B15*1 enn ved polymorfismeallelen UGT2B15*2. Det er brukt hybridiserende prober slik at det kun blir fluorescens når begge probene har hybridisert i nærheten av hverandre til enkelttrådet DNA.

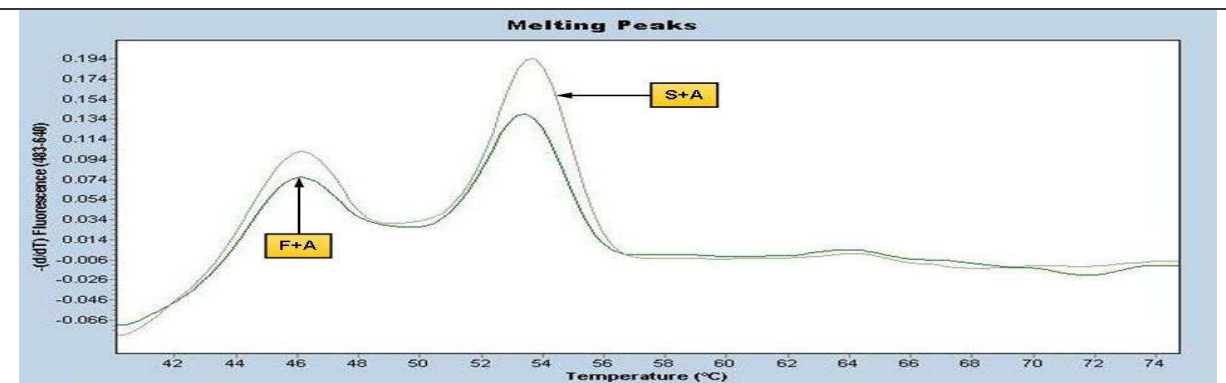
Ved den første kjøringen med real time PCR ble alle de fire mulige primerkombinasjonene forsøkt på fire prøver med gDNA. Det ble laget en mastermix for hver av de følgende primerkombinasjonene F+A, F+R, S+A og S+R. Mastermixen inneholdt 0,5 μ M av hver primer, 0,2 μ M av hver probe, LC[®] Genotyping Master og 5,0 μ l gDNA (ca 35,2 ng/ μ l) med et totalvolum på 20 μ l. Hver primerkombinasjon ble forsøkt på fire prøver med gDNA. I protokollen ble det brukt en hybridiseringstemperatur på 48 °C som er ca 5 °C under den beregnede hybridiseringstemperaturen for primerene. Smeltekurvsanalysen viste at fluorescensverdiene var lave og toppene for smeltepunktstemperatur var ikke helt som

forventet for noen av primerkombinasjonene. Begge primerkombinasjonene der revers primer R inngikk, gav resultater med topper for smeltpunktstemperatur som ikke var klart atskilte fra hverandre. Både F+A og S+A kombinasjonen gav klart atskilte topper for smeltpunktstemperatur. Et uventet resultat for begge kombinasjonene er at de for den ene prøven gav tre topper for smeltpunktstemperatur. Det var den samme prøven som fikk tre topper i begge tilfellene. Det forventede antall topper for smeltpunktstemperatur er en til to topper for hver prøve. Ved sammenligning av primerkombinasjonene F+A og S+A viste det seg at differansen mellom maksimal og minimal fluorescens var større ved bruk av S+A enn ved bruk av F+A. Resultatene fra den første kjøringen av real time PCR med UGT2B15 tyder på at revers primeren R ikke fungerer optimalt for amplifikasjon av UGT2B15. De to primerkombinasjonene F+A og S+A så ut til å fungere bra og det så ut til at S+A gav det beste og tydeligste resultatet. Både F+A og S+A kombinasjonen gav en topp mer enn forventet for smeltpunktstemperaturen for en av prøvene med gDNA. I Figur 6.1.3.a er det vist tre smeltekurveanalyser og en kurve for fluorescensintensitet. Den første smeltekurveanalysen er for en prøve av gDNA med primerkombinasjonene F+R og S+R. Kurvene viser at toppene for smeltpunktstemperatur ikke er klart adskilte ved bruk av F+R eller S+R. Det andre bildet viser at toppene ved smeltekurveanalyse er klart adskilte ved bruk av primerparene F+A og S+A. I tillegg er det mulig å se at endringen i fluorescens kommer tydeligere fram med S+A enn med F+A. Det skyldes at bruk av S+A gir større differanse mellom maksimal og minimal fluorescens enn ved bruk av F+A. I det tredje bildet er differansen mellom maksimal og minimal fluorescens intensitet for primerparene F+A og S+A vist. Begge kurvene er for samme prøve av gDNA og det er tydelig at S+A gir større differanse i fluorescens intensitet enn F+A. Fjerde bilde viser hvordan både F+A og S+A gir tre topper for smeltpunktstemperatur for den ene pasientprøven.

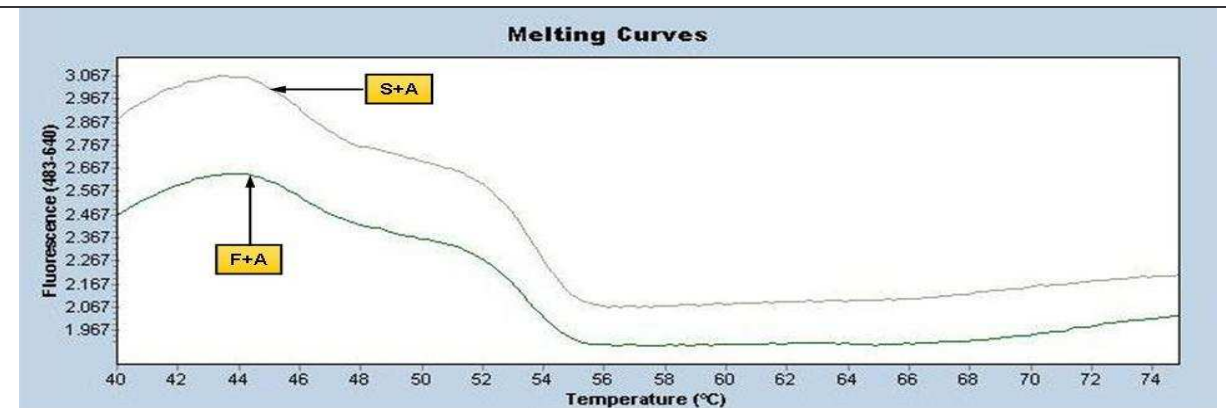
Primerkombinasjonene F+R og S+R



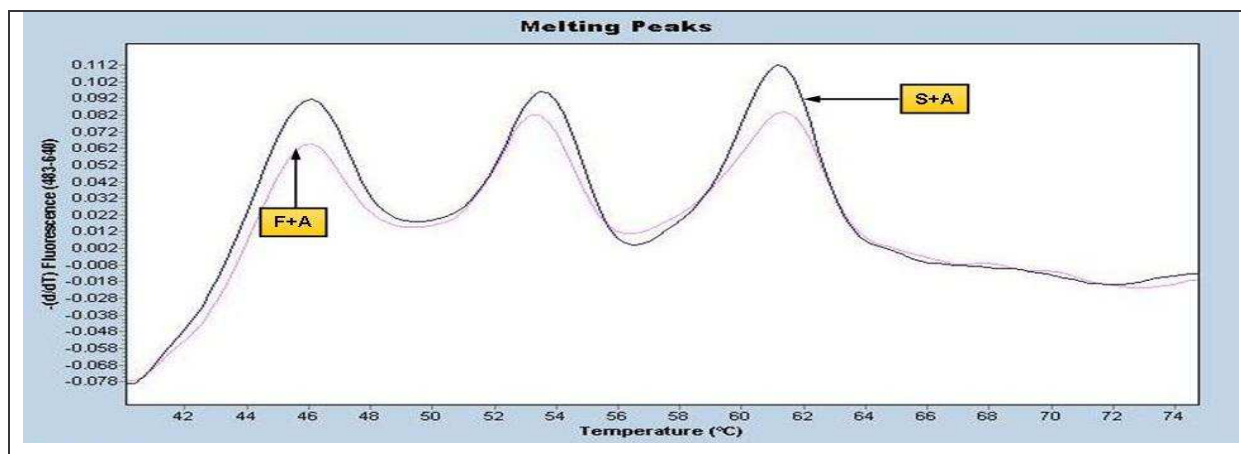
Primerkombinasjonene F+A og S+A



Fluorescens intensitet med F+A og S+A



Pasientprøven T14 får tre toppar med primerkombinasjonene F+A og S+A

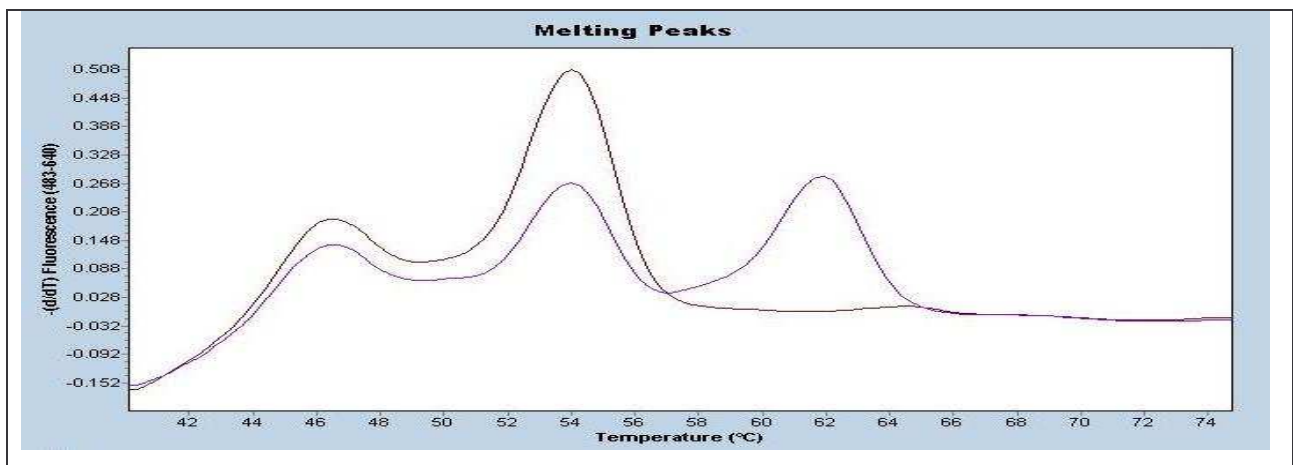


Figur 6.1.3.a Smeltekurveanalyse for UGT2B15 ved primerkombinasjonene F+R, S+R, F+A og S+A

Ved andre kjøring på real time PCR med UGT2B15 ble primerparet S+A brukt siden det gav det beste resultatet ved første kjøring med UGT2B15. Det ble laget en mastermix med asymmetrisk konsentrasjon av primerene for å kompensere for hook effekten som ble observert under første kjøring av UGT2B15. For å kunne sammenligne asymmetrisk og symmetrisk primerkonsentrasjon ble det også laget en mastermix med symmetrisk konsentrasjon av S og A. I tillegg ble det brukt både 2,5 μl og 5 μl gDNA (ca 35,2 ng/ μl) i mastemixene for å se om templat mengden hadde noen innvirkning på resultatet. Det gir i alt fire mulige kombinasjoner, som ble brukt på to pasientprøver. De to mastermixene med asymmetrisk mengde av primerene inneholdt 0,5 μM av S og 0,25 μM av A. De to mastermixene med symmetrisk mengde av primerene inneholdt 0,5 μM av A og 0,5 μM av S. Samtlige mastermixer inneholdt i tillegg 0,2 μM av hver probe og LC[®] Genotyping Master i et totalvolum på 20 μl . Hybridiseringstemperaturen ble økt med 7°C til 55 °C i forhold til første kjøring av UGT2B15 på real time PCR. Smeltekurven viste en tilfeldig fluorescens i forhold til baselinjen og ved smeltekurveanalyse var det ingen topper for smeltepunktstemperatur. Resultatet kan tyde på at hybridiseringstemperaturen har vært for høy til å få amplifikasjon av UGT2B15.

Ved de to neste kjøringene med UGT2B15 på real time PCR ble det brukt en asymmetrisk konsentrasjon av primere. Hybridiseringstemperaturen ble satt til 50°C og det ble det brukt 2,5 μl gDNA per brønn. Det ble laget en mastermix med 0,5 μM av S og 0,25 μM av A, 0,2 μM av hver probe, LC[®] Genotyping Master og 2,5 μl gDNA (ca 35,2 ng/ μl) med et totalvolum på 20 μl . Den første av disse kjøringene gav høyere fluorescens intensitet enn noen av de tidligere kjøringene på real time PCR med UGT2B15. Det tyder på at 50°C er en bedre hybridiseringstemperatur for primerparet S+A enn 48°C. Smeltekurveanalysen av de

seks prøvene som ble undersøkt med real time PCR viser tydelige og adskilte topper for smeltepunktstemperatur. Igjen viser det seg at en av prøvene får tre topper for smeltepunktstemperatur og det er som tidligere nevnt en topp mer enn forventet. I figur 6.1.3.b er smeltekurveanalyse for to prøver av gDNA vist. Den ene prøven har to topper og det er et forventet resultat dersom templatet er heterozygot med to allele varianter for området hvor proben hybridiserer med DNA tråden. Den andre prøven har tre topper for smeltepunktstemperatur og det tyder på en ekstra enkeltnukleotid polymorfisme i området hvor proben hybridiserer med DNA tråden. En annen forklaring er at primerene hybridiserer uspesifikt. Da blir amplifikasjonen uspesifikk og probene kan da binde til mer enn en sekvens, og det vises som flere topper for smeltepunktstemperatur. For at den siste forklaringen skal stemme er det nødvendig å anta at probene hybridiserer med mer enn en DNA sekvens med en varierende grad av komplementaritet mellom proben og DNA sekvensene. Varierende grad av komplementaritet mellom probe og DNA sekvens vil resultere i flere topper for smeltepunktstemperatur.



Figur 6.1.3.b Smeltekurveanalyse for to pasientprøver av UGT2B15 etter real time PCR med hybridiseringstemperatur 50°C. Den ene pasientprøven får to topper, mens den andre får tre topper for smeltepunktstemperatur. To topper er forventet dersom pasientprøven er heterozygot, mens tre topper er en mer enn forventet. En forklaring på tre topper for smeltepunktstemperatur er at området hvor proben hybridiserer med DNA tråden inneholder mer enn en enkeltnukleotidpolymorfisme. En annen mulighet er uspesifikk amplifikasjon, som gjør at proben hybridiserer med mer enn en DNA sekvens.

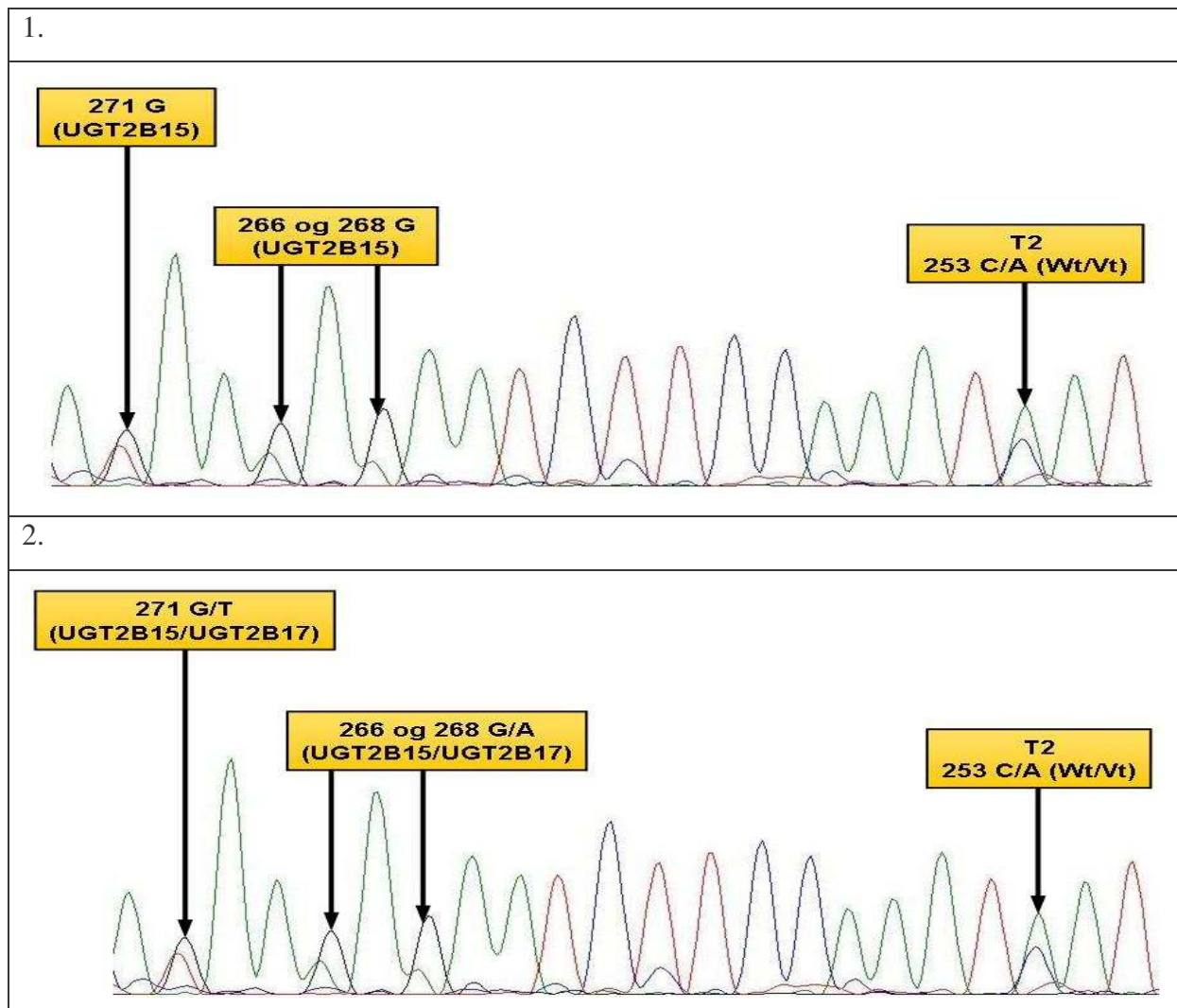
På grunn av de ovenfor nevnte resultatene ble fire aktuelle prøver som allerede var undersøkt med real time PCR, sendt til sekvensering. Vanlig PCR med primerparet S+A og hybridiseringstemperatur 55 °C ble brukt til amplifikasjon. Produktet ble så separert på 2 %

agarose gel og deretter ekstrahert med QIAquick Gel extraction Kit. Resultatene fra sekvenseringen viste at det forekom dobbel sekvens. Det betyr at amplifikasjonen ikke er spesifikk for UGT2B15. Deretter ble hele sekvensen til PCR produktet for UGT2B15 blastet mot et genomisk bibliotek (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for å finne hvilke andre gener primerkombinasjonen S+A kan hybridisere med. Søket viste at S+A kan hybridisere med både UGT2B15 og UGT2B17.

I et forsøk på å få spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 ble det satt opp en nested PCR reaksjon. Primerparet F+R ble brukt til den første PCR reaksjonen og deretter ble PCR produktet separert på 2 % agarose gel. Det var meningen å bruke primerparet S+A til en sekvenseringsreaksjon, men UV fotografering av agarose gelen viste kun svake bånd med PCR produkt. Det var derfor tydelig at utbyttet fra PCR reaksjonen var for lavt til å gå videre til sekvensering.

Seinere ble primerparet S+A og en gradvis økende hybridiseringstemperatur brukt for å få spesifikk amplifikasjon av UGT2B15. Vanlig PCR ble brukt til amplifikasjon og produktet ble deretter separert på agarose gel, ekstrahert og til slutt ble det satt opp en sekvenseringsreaksjon. Det var kun hybridiseringstemperaturen i den vanlige PCR reaksjonen som gradvis ble justert. Ved hybridiseringstemperatur 57 °C var det kun svake bånd med PCR produkt på agarose gelen. Selv om båndene var svake, ble produktet ekstrahert og det ble satt opp en sekvenseringsreaksjon for prøvene T22 og T27. For T10 var båndet for svakt og utbyttet for lite til å ekstrahere. Av de fire sekvenseringsresultatene var kun en sekvens leselig. Til gjengjeld så det ut til at det kun UGT2B15 var blitt amplifisert. Bilde 1 i figur 6.1.3.c viser et utsnitt fra sekvenseringsresultatet. Området som blir vist inneholder sekvensen hvor UGT2B15 i noen tilfeller har enkeltnukleotidpolymorfismen 253 G>T. Dobbelt amplifikasjon av UGT2B15 og UGT2B17 vil være synlig i kromatogrammene der sekvensen til UGT2B17 er forskjellig fra sekvensen til UGT2B15. Innenfor sekvensen hvor UGT2B15 C hybridiserer er det to forskjeller mellom UGT2B15 og UGT2B17. I posisjon 266 og 268 har UGT2B15 C mens, UGT2B17 har T. Lengre vekk fra området hvor UGT2B15 har enkeltnukleotidpolymorfismen 253 G>T er det flere forskjeller mellom sekvensene til UGT2B15 og UGT2B17. De nærmeste forskjellene er de fem forskjellene innenfor sekvensen hvor UGT2B15 Anc hybridiserer med DNA trådene. I posisjon 271, som er den første nukleotiden i proben UGT2B15 Anc, har UGT2B15 C, mens UGT2B17 har A og denne posisjonen er også vist i figuren. Bilde 2 i figur 6.1.3.c viser den tilsvarende sekvensen for en annen pasientprøve der hybridiseringstemperaturen var 55 °C. Her synes den doble sekvenseringen av UGT2B15 og UGT2B17 i posisjonene 266, 268 og 271 ved at det er utslag

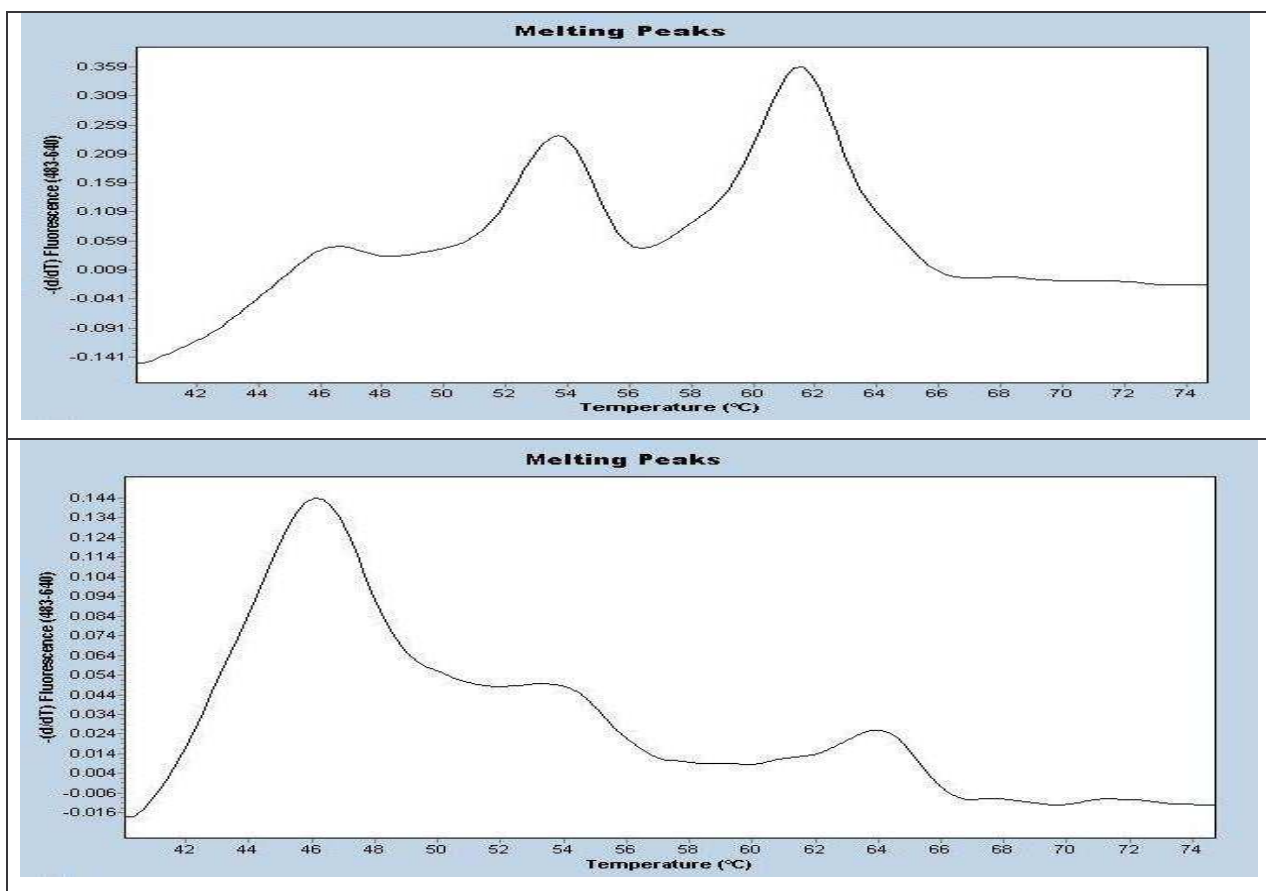
for nukleotidene som er i sekvensen til UGT2B15 og de som er i sekvensen til UGT2B17. Dermed er det i posisjon 266 og 268 utslag for både G og A (3'-5' DNA tråd), mens det i posisjon 271 er utslag for både G og T (3'-5* DNA tråd).



Figur 6.1.3.c Bilde 1 og 2 viser begge sekvenseringsresultat for UGT2B15 for området som hovedsakelig er dekket av proben UGT2B15 C. De to sekvenseringsreaksjonene er kjørt med reversprimer A. Området inneholder enkeltnukleotidpolymorfismen UGT2B15 253 G>T og tre av nukleotidposisjonene hvor UGT2B15 og UGT2B17 har ulik sekvens. I posisjon 266 og 268 har UGT2B15 C mens UGT2B17 har T, og i posisjon 271 har UGT2B15 C, mens UGT2B17 har A. Fargekoden for kromatogrammene i sekvenseringsreaksjonen er: grønn står for Adenin (A), blå står for Cytosin (C), svart står for Guanin (G) og rød står for Thymin (T). Siden DNA tråden er 3'-5' viser figuren basene som er komplementære til det som er besrevet i teksten.

Resultatet fra sekvenseringen som er nevnt ovenfor gav håp om at det var mulig å få til spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 ved høy hybridiseringstemperatur med primerparet

S+A. Ved real time PCR fører spesifikk amplifikasjon til flere topper for smeltepunktstemperatur enn forventet. For å se om det var mulig å bli kvitt problemet med tre topper for smeltepunktstemperatur ble hybridiseringstemperaturen gradvis økt. Ved 58 °C var det i noen tilfeller fremdeles tre topper for smeltepunktstemperatur. Det ble tolket som at det fortsatt var uspesifikk amplifikasjon av både UGT2B15 og UGT2B17. Ved ytterligere økning av hybridiseringstemperaturen til 59 °C ble proporsjonene på smeltekurveanalysen totalt endret. Det var allikevel fremdeles antydning til tre topper for smeltepunktstemperatur for enkelte prøver. I Figur 6.1.3.d er smeltekurveanalysen for en prøve vist etter real time PCR der hybridiseringstemperaturen var henholdsvis 58 °C og 59 °C.



Figur 6.1.3.d Smeltekurveanalyse for UGT2B15 ved 58°C (øverst) og 59°C (nederst). Den samme pasientprøven er brukt i begge tilfellene. Bildene viser at det fortsatt er tre topper for smeltepunktstemperatur ved begge temperatuene. Det viser at amplifikasjonen fortsatt er uspesifikk selv om hybridiseringstemperaturen nærmer seg den øvre temperaturgrensen for amplifikasjon.

De siste resultatene for real time PCR tyder på at det er vanskelig å få spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 bare ved å øke hybridiseringstemperaturen med de primerene som er brukt i denne studien.

6.2 Relasjon mellom UGT1A4 allele og serum konsentrasjon av tamoxifen og metabolitter

I Tabell 6.1.2.a er fordelingen av UGT1A4 alleletypene *1 og *3 i det undersøkte materialet av pasientprøver beskrevet. Det ble da funnet at 160 (87,91 %) var homozygot for UGT1A4*1, 21 (11,54 %) var heterozygot med UGT1A4*1 og UGT1A4*3 og 1 pasientprøve (0,55 %) var homozygot for UGT1A4*3. Tidligere er serumkonsentrasjonene av tamoxifen, og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og NDDTAM målt med en HPLC - tandem MS metode beskrevet av Gjerde [68]. I den videre analysen er pasientprøver der det mangler målinger for serumkonsentrasjonene ekskludert. Til sammen er 31 pasientprøver ekskludert fra den videre analysen. Av disse er 2 heterozygote og 29 homozygote for UGT1A4*1 (Wt /Wt). Tabell 6.2.a viser fordelingen av UGT1A4 alleltypene i prøvematerialet som ble analysert for en sammenheng mellom UGT1A4 allele type og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og NDDTAM. Tabellen viser også prosentfordelingen av alleltypene i hele utvalget. Sammenligning av de kolonnene for prosentfordeling viser at den prosentvise fordelingen av alleltypene er tilnærmet den samme i utvalget som ble analysert for sammenheng mellom UGT1A4 genotype og serumkonsentrasjoner, som i hele utvalget.

Allele type	Pasientprøver inkludert i analysen	Prosent andel av analysert materiale	Prosent andel av hele utvalget
UGT1A4*3 / UGT1A4*3	1	0,66	0,55
UGT1A4*1 / UGT1A4*3	19	12,58	11,54
UGT1A4*1/ UGT1A4*1	131	86,76	87,91
Sum	151	100	100

Tabell 6.2.a Fordeling av UGT1A4 alleltyper i utvalget som ble analysert for en sammenheng mellom UGT1A4 alleltype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og NDDTAM. I tillegg er fordelingen i hele utvalget vist for sammenligning.

Serumkonsentrasjonene av tamoxifen og de fem metabolittene er beskrevet i tabell 6.2.b, og i tillegg er verdiene for SHBG og FSH oppgitt. Målingene for SHBG og FSH er utført tidligere med Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). For det analyserte utvalget er median alder 57 år, gjennomsnittlig alder 59,6 år og intervallet 57,6 – 61,6 år er et 95 % konfidensintervall for gjennomsnittsalderen. De utførte beregningene viste at utvalget var i Hardy-Weinberg likevekt og χ^2 test viste at fordelingen av genotypene tilsvarte funn i en tidligere studie [69].

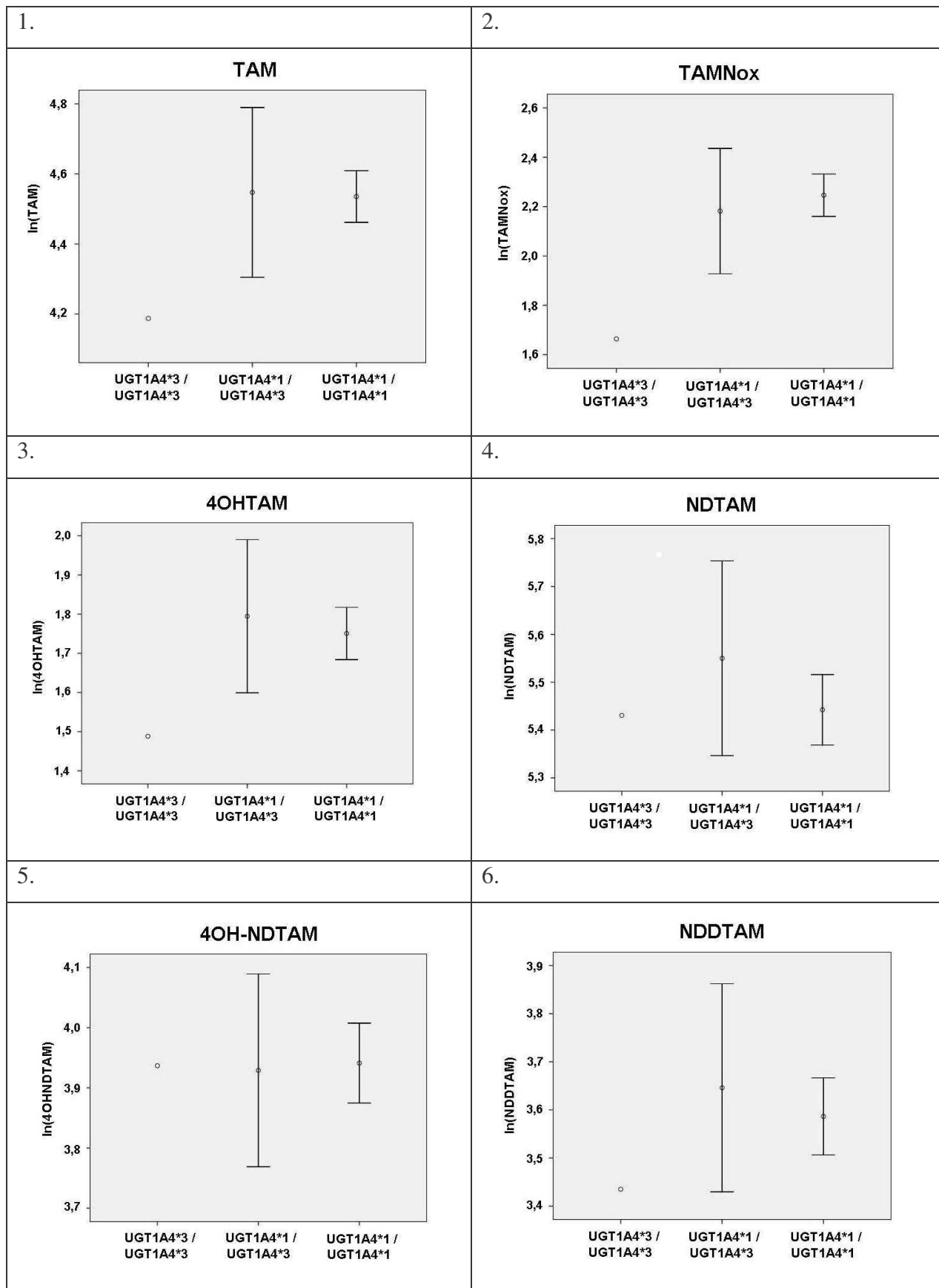
Variabel	Median	Gjennomsnitt	95 % Konfidensintervall for gjennomsnittet
FSH	35,8 IE/L	38,5 IE/L	34,0 – 43,1 IE/L
SHBG	77,0 nmol/L	80,1 nmol/L	75,5 – 84,8 nmol/L
tamoxifen	89,9 ng/ml	102,4 ng/ml	94,8 – 110,01 ng/ml
TAMNox	9,4 ng/ml	10,6 ng/ml	9,7 – 11,6 ng/ml
4OHTAM	5,67 ng/ml	6,2 ng/ml	5,8 – 6,7 ng/ml
NDTAM	225,7 ng/ml	256,1 ng/ml	237,9 – 274,3 ng/ml
4OHNDTAM	49,6 ng/ml	55,4 ng/ml	51,5 – 59,3 ng/ml
NDDTAM	37,0 ng/ml	40,3 ng/ml	37,3 – 43,4 ng/ml

Tabell 6.2.b Biokjemiske og farmakologiske parametere for det analyserte utvalget av pasientprøver (N=151). For serumkonsentrasjonen av FSH, SHBG, tamoxifen, TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og NDDTAM er median gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall for gjennomsnitt oppgitt. Konsentrasjonsenhetene er oppgitt bak tallverdiene. Forklaring av forkortelser: Seksual hormon bindende globulin (SHBG), Follikel stimulerende hormon (FSH), tamoxifenNoxid (TAMNox), 4-hydroxytamoxifen (4OHTAM), N-demetyltamoxifen (NDTAM), 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen (4OHNDTAM), N-dedimetyltamoxifen (NDDTAM).

Figur 6.2.a viser sammenhengen mellom de tre kategoriene av UGT1A4 genotype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTam, 4OHNDTAM og NDDTAM. Figur 6.2b viser ratioen mellom serum konsentrasjonene for 4OHTAM / TAM, NDTAM / TAM, 4OHNDTAM / NDTAM og NDDTAM / NDTAM. Pasientprøvene som er homozygote for UGT1A4*1a allelen er valgt som referansegruppe. Grunnen er at denne gruppen har den vanligste alleltypen, som er uten

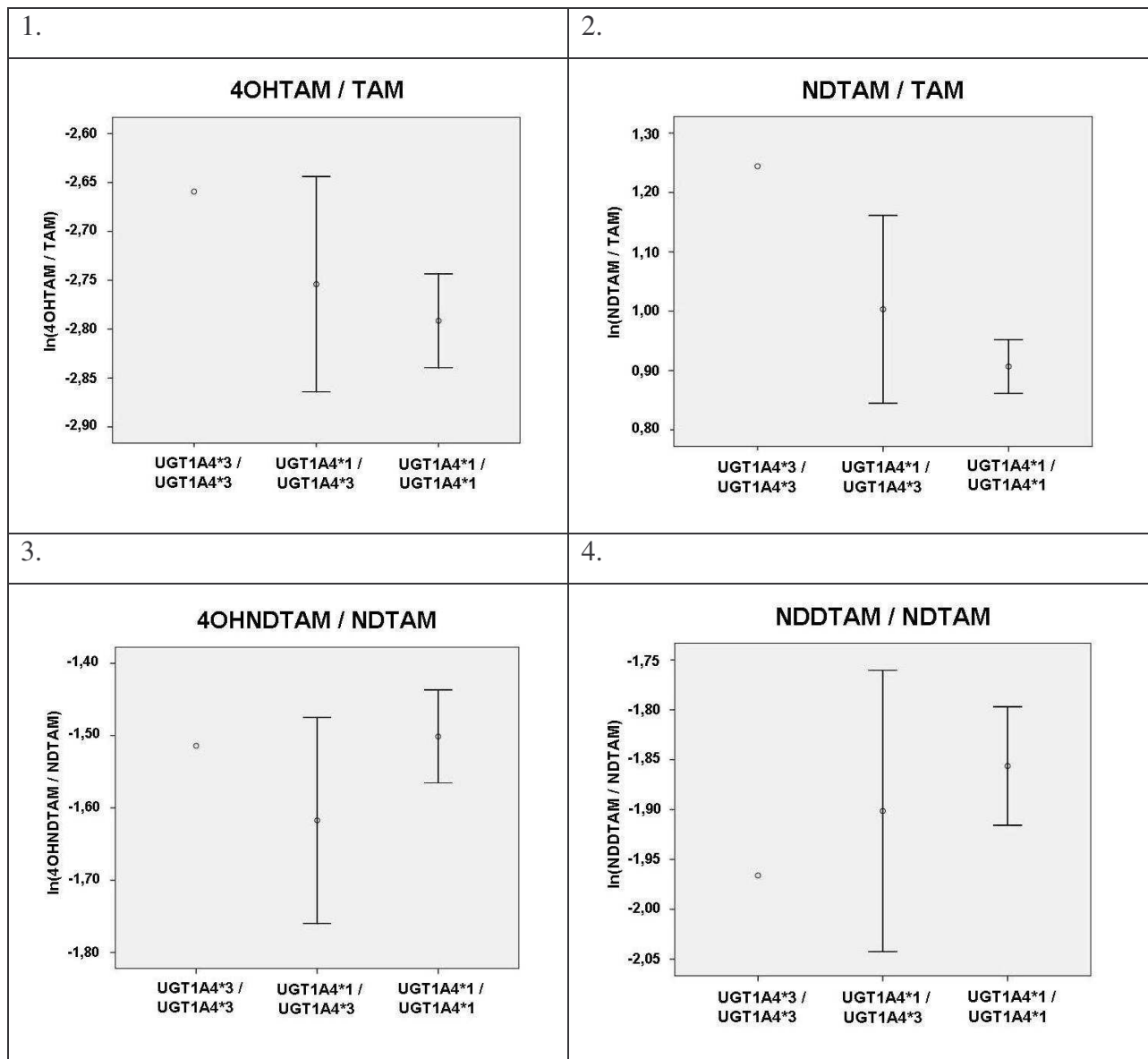
enkeltnukleotidpolymorfismen som påvirker aktiviteten til UGT1A4 enzymet. Denne gruppen er også den største gruppen.

Bilde 1,2 og 3 i figur 6.2.a viser at serumkonsentrasjonen av tamoxifen og metabolittene TAMNox og 4OHTAM er lavere for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 allelen enn for de to andre gruppene. I alle tilfellene har H8 en serumkonsentrasjon som er lavere enn både gjennomsnittet og konfidensintervallet til de to andre gruppene. For den heterozygote gruppen og gruppen som er homozygot for UGT1A4*1 allelen er serumkonsentrasjonene av tamoxifen og metabolittene TAMNox og 4OHTAM relativt like. Den eneste forskjellen er at den heterozygote gruppen har et noe videre konfidensintervall. Videre viser figuren at serumkonsentrasjonen av NDTAM er relativt lik for alle gruppene. I dette tilfellet har H8 en serumkonsentrasjon som er tilnærmet lik gjennomsnittet for gruppen som er homozygot for UGT1A4*1 allelen. Også her er konfidensintervallet til den heterozygote gruppen videre enn konfidensintervallet til referansegruppen som er homozygot for UGT1A4*1 allelen. På samme måte som for NDTAM er serumkonsentrasjonene for metabolitten 4OH-NDTAM tilnærmet identisk for alle de tre gruppene. Det siste bildet i figur 6.2.a viser at for metabolitten NDDTAM har H8 igjen en noe lavere serumkonsentrasjon enn referansegruppen. I dette tilfellet ligger serumkonsentrasjonen til H8 innenfor den nedre grensen av konfidensintervallet til den heterozygote gruppen.



Figur 6.2.a Relasjon mellom serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolittene TAMNox, 4OHTAM, NDTAM, 4OH-NDTAM og NDDTAM og UGT1A4 alleltype ved steady state. Serumkonsentrasjonene er \ln transformert og det er beregnet gjennomsnittsverdi og 95 % konfidensintervall. Forklaring av forkortelser:

tamoxifenNoxid (TAMNox), 4-hydroxytamoxifen (4OHTAM), N-demetyltamoxifen (NDTAM), 4-hydroxy-N-demetyltamoxifen (4OHNDTAM), N-dedimetyltamoxifen (NDDTAM).



Figur 6.2.b Ratio mellom serumkonsentrasjonene for tamoxifen, 4OHTAM, NDTAM, 4OH-NDTAM og NDDTAM ved steady state. De ln transformerte serumkonsentrasjonen er delt på hverandre som angitt i overskriftene.

Figur 6.2.b viser at for ratioen 4OHTAM/TAM har H8 en ratio som er noe større enn ratioen for referansegruppen. I forhold til den heterozygote gruppen har H8 en høy ratio, men den er innenfor konfidensintervallet til den heterozygote gruppen. I det andre bildet viser figuren at ratioen for NDTAM/TAM er større for H8 enn for de to andre gruppene. Forskjellen er visuelt tydelig og logistisk regresjon har vist at forskjellen er statistisk signifikant på 0,05 nivå. Figurens tredje bilde viser at ratioen 4OHNDTAM/NDTAM er relativt lik for H8 og referansegruppen. Den heterozygote gruppen har en noe lavere gjennomsnittsverdi og et større konfidensintervall enn referansegruppen. Det siste bildet i figuren viser ratioen for NDDTAM/NDTAM. For H8 er ratioen noe lavere enn for referansegruppen, men med god margin innenfor konfidensintervallet til den heterozygote gruppen.

7. Diskusjon

7.1.1 Real time PCR

Innen molekylærbiologi har PCR vært en viktig metode siden Mullis og samarbeidspartnerne utviklet metoden på 1980 tallet [70, 71]. Siden den gang har metoden gjennomgått en rekke endringer og forbedringer. Et viktig trinn i utviklingen var utviklingen av real time PCR, som gjorde det mulig å få spesifikk amplifikasjon av en DNA sekvens og samtidig foreta fortløpende målinger av hvor mye PCR produkt som ble dannet i løpet av syklusene [72]. Real time PCR har flere bruksområder som for eksempel deteksjon av patogene mikroorganismer [73], analyse av genekspressjon [74, 75] og analyse av enkeltnukleotidpolymorfismer [76]. I litteraturen er det beskrevet hvordan hybridiserende prober og Real time PCR kan bli brukt til å detektere enkeltnukleotidpolymorfismer [77]. I denne masteroppgaven er det blant annet brukt LightCycler[®] 480 og smeltekurvsanalyse for å studere enkeltnukleotidpolymorfismer i UGT1A4 og UGT2B15 genene [63, 65].

7.1.2 Etablering av real time PCR metode for UGT1A4

En rekke enkeltnukleotidpolymorfismer og kombinasjoner av disse er beskrevet for UGT1A4 genet [78, 79]. I litteraturen er det beskrevet hvordan PCR og sekvensering kan brukes til å finne og bestemme tilstedeværelse av enkeltnukleotidpolymorfismer i UGT1A4 genet [78]. Det er også mulig å bestemme tilstedeværelse av kjente UGT1A4 enkeltnukleotidpolymorfismer ved hjelp av amplifikasjon med PCR, kutting av PCR produkt med restriksjonsenzymmer og analyse på gel [79]. I prosessen med å få cellekulturer til å overuttrykke en variant av UGT1A4 enzymet er det vanlig å bruke PCR til amplifikasjon av den aktuelle allel, som deretter blir transfektert inn i cellene [42, 43].

I løpet av denne masteroppgaven er det etablert en real time PCR metode som kan brukes til å identifisere enkeltnukleotidpolymorfismen UGT1A4 142 T>G (48 L>V). Metoden ble kvalitetssikret ved å sammenligne resultater fra smeltekurveanalyse med resultater fra sekvensering. En fordel med real time PCR er at det er mulig å undersøke mange prøver samtidig og resultatene er enkle å tolke. Etter at metoden var etablert ble den brukt til å

undersøke forekomsten av UGT1A4 enkelt nukleotidpolymorfismen 142 T>G i prøvematerialet som er beskrevet i 4.1 Biologisk materiale.

7.1.3 Forsøk på etablering av real time PCR metode for UGT2B15

For UGT2B15 genet er det beskrevet flere polymorfismer [80-84], som så gir grunnlag for inndeling i allelvarianter av genet. Det er beskrevet hvordan PCR og sekvensering kan brukes til å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen 253 G>T (Asp>Tyr) [83]. Det har i løpet av denne masteroppgaven blitt gjort forsøk på innkjøring av en real time PCR metode for å identifisere UGT2B15 253 G>T polymorfismen. Innenfor UGT2 gruppen er det stor sekvenslikhet og for de to enzymene UGT2B15 og UGT2B17 er det 95 % likhet i sekvensen [85]. Den store graden av sekvenslikhet mellom UGT2B15 og UGT2B17 har gjort det vanskelig å oppnå spesifikk amplifikasjon av UGT2B15. Like i nærheten av 253 G>T polymorfismen finnes det ytterligere en enkelt nukleotidpolymorfisme 256 T >C. Allelnavnet for de to polymorfismene er henholdsvis UGT2B15*2 (253 T) og UGT2B15*3 (256 C). Proben UGT2B15 C dekker begge de to enkelt nukleotidpolymorfismene. Det gjør det mer komplisert å få til en real time PCR metode for UGT2B15*2. Det er mulig at de to polymorfismene i sekvensen hvor UGT2B15 C binder kan gi likt resultat. En annen mulighet er at tilstedeværelse av begge polymorfismene i samme prøve kan gi et uklart resultat som er vanskelig å tolke. Dersom de to polymorfismene gir resultater som klart lar seg skille fra hverandre vil det være en overkommelig utfordring at proben UGT2B15_C hybridiserer med en sekvens som inneholder to enkelt nukleotidpolymorfismer. Resultatene fra de gjennomførte forsøkene tyder på at det ikke lar seg gjøre å oppnå spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 med primerene som har blitt brukt. Det vil derfor ikke være aktuelt å bruke real time PCR til genotyping av UGT2B15 med de gjeldende primerene. Ved amplifikasjon med vanlig PCR og sekvensering av PCR produkt forekom det dobbel sekvens med både UGT2B15 og UGT2B17. Det er mulig å skille de to sekvensene fra hverandre i det kritiske området for UGT2B15 253 G>T polymorfismen. Dermed er det mulig å bruke amplifikasjon med PCR og sekvensering til å bestemme allele typen til UGT2B15. I et videre arbeid med å etablere en real time PCR metode for UGT2B15 vil det være naturlig å vurdere design og syntese av nye primere for å oppnå spesifikk amplifikasjon av UGT2B15. Det er også naturlig å søke i litteraturen og vurdere spesifisiteten til primere som tidligere er brukt til amplifikasjon av

UGT2B15 genen. Undervegs, mens forsøkene med en real time PCR metode for UGT2B15 har pågått, er det blitt publisert en artikkel som beskriver bruk av real time PCR til identifikasjon av enkelt nukleotidpolymorfismen UGT2B15 253 G>T [86]. Manglende informasjon om hvilke primere og prober som er brukt gjør at det ikke er mulig å foreta en grundig sammenligning av metoden som er brukt og forsøkene som er gjennomført i løpet av denne masteroppgaven.

7.2 Relasjon mellom UGT1A4 alleler og serum konsentrasjon av tamoxifen og metabolitter

Glukuronidering er en viktig fase II reaksjon for tamoxifen og metabolitter og bidrar til økt vannløselighet og utskilling av tamoxifen og metabolitter. Fra litteraturen er det kjent at UGT1A4 er viktig for N-glukuronidering av tamoxifen og 4OHTAM [40-42]. Det er påvist en rekke enkelt nukleotidpolymorfismer som gir opphav til flere forskjellige allele varianter av UGT1A4 [78]. I en studie ble det vist at de to kjente UGT1A4 enkelt nukleotidpolymorfismene 70 C>A (24 P>T) og 142 T>G (48 L>V) leder til endret enzymatisk aktivitet ved glukuronidering av xenobiotika og steroider [69]. Begge polymorfismene førte til redusert glukuronidering av β -naphthylamine, benzidine trans androsteron og dihydrotestosteron i forhold til UGT1A4*1 (Wt). I en annen studie er det rapportert at humane lever mikrosomer som er homozygote for 24 T polymorfismen har økt aktivitet ved N-glukuronidering av 4-metylnitroamino-1-3-pyridyl-1-butanol (NNAL) i forhold til lever mikrosomer som er homozygote for UGT1A4 24 P [79]. De ovenfor nevnte resultatene tyder på at både 24 P>T og 48 L>V polymorfismen kan ha konsekvenser for glukuronideringsaktiviteten til UGT1A4 enzymet. I tillegg tyder datene på at substratet for glukuronideringsreaksjonen har betydning for om polymorfismen 24 P>T gir økt eller redusert glukuronideringsaktivitet [69, 79]. I en seinere studie med humane lever mikrosomer er betydningen av de to polymorfismene i forhold til glukuronidering av tamoxifen og 4OHTAM undersøkt. Det ble rapportert at UGT1A4 24 P>T polymorfismen ikke hadde noen betydning for glukuronideringsaktiviteten til UGT1A4 av tamoxifen eller 4OHTAM. I den samme studien ble det rapportert at polymorfismen 48 L>V førte til økt glukuronideringsaktivitet av tamoxifen og 4OHTAM i forhold til UGT1A4 uten polymorfismen [42]. Siden aktiviteten av UGT1A4 glukuronidering og dermed eliminering av

de farmakologisk viktige forbindelsene tamoxifen og 4OHTAM blir påvirket av polymorfismen 48 L>V er det nærliggende å spekulere i om den aktuelle polymorfismen har en innvirkning på serumkonsentrasjonen av tamoxifen og 4OHTAM.

I denne masteroppgaven har det blitt undersøkt om det er mulig å finne en sammenheng mellom UGT1A4 allele type og serumkonsentrasjonene av tamoxifen og metabolittene 4OHTAM, NDTAM, 4OHNDTAM og TAMNox. I den statistiske analysen ble pasientprøvene delt inn i tre grupper. En gruppe var homozygot for UGT1A4*1, en gruppe var heterozygot med en UGT1A4*1 og en UGT1A4*3 allele og en gruppe var homozygot for UGT1A4*3 allelen. Den førstnevnte gruppen er referansegruppe i analysen siden det er den vanligst forekommende alleletypen (Wt) og den enzymatiske aktiviteten til det tilhørende enzymet regnes for å være det normale aktivitetsnivå. Det ble bare funnet en pasientprøve som var homozygot for UGT1A4*3 og den gruppen inneholder derfor bare ett datasett.

Logistisk regresjon viste ingen statistisk signifikant sammenheng mellom UGT1A4 allele type og serumkonsentrasjonene. Det var allikevel mulig å observere trender som kan tyde på en sammenheng mellom pasientprøven som var homozygot for UGT1A4*3 og serumkonsentrasjonene. Selv om resultatene ikke er statistisk signifikante vil de viktigste tendensene bli kort diskutert i det følgende. Det er to grunner til å foreta en kortfattet diskusjon av de observerte usignifikante tendensene. Den ene grunnen er at noen av observasjonene for pasientmaterialet stemmer overens med tidligere funn ved studier *in vitro*, og dermed kan de indikere at de samme mekanismene gjør seg gjeldene i mennesker. Den andre grunnen gjelder resultater som er interessante fordi de kan brukes til å spekulere i substrat spesifisiteten til UGT1A4 i forhold til tamoxifen metabolitter der det enda ikke er publisert enzymatiske studier på UGT aktivitet.

Serumkonsentrasjonene for tamoxifen og 4OHTAM er redusert, mens serumkonsentrasjonen av 4OH-NDTAM er uendret for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 i forhold til gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. Observasjonene stemmer overens med funn i tidligere studier der det er påvist at UGT1A4 er viktig for glukuronidering av tamoxifen [40, 42], deltar i glukuronidering av 4OHTAM [40-42] og at UGT1A4 ikke har noen enzymatisk aktivitet overfor 4OH-NDTAM [43]. Tendensen til at pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 har lavere serumkonsentrasjon av tamoxifen og 4OHTAM stemmer overens med en tidligere studie der det ble påvist at UGT1A4^{48Val} (kodet av UGT1A4*3) har økt aktivitet ved glukuronidering av 4OHTAM i forhold til UGT1A4^{48Leu} (kodet av UGT1A4*1) [42]. De observerte tendensene i denne studien stemmer dermed overens med funn i tidligere studier.

Serumkonsentrasjonen for TAMNox er lavere for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 i forhold til gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. Serumkonsentrasjonen av NDTAM er tilnærmet lik for de to gruppene, mens det ser ut til at serumkonsentrasjonen av NDDTAM er noe lavere for pasientprøven som er homozygot for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 enn for gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. For tamoxifen metabolittene TAMNox, NDTAM og NDDTAM er det så vidt jeg kjenner til ikke publisert enzymatiske studier for glukuronidering. Med utgangspunkt i resultatene i denne studien er det mulig å spekulere i substrat spesifisiteten til UGT1A4 i forhold til TAMNox, NDTAM og NDDTAM. Det at UGT1A4 alleletype ser ut til å ha innvirkning på serumkonsentrasjonen av TAMNox kan tyde på at UGT1A4 bidrar til glukuronidering av TAMNox. En alternativ forklaring er at den observerte tendensen skyldes en indirekte sammenheng på grunn av økt UGT1A4 N-glukuronidering av tamoxifen for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3. Den tilnærmet like serumkonsentrasjonen av NDTAM hos pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 og gruppen som er homozygot for UGT1A4*1 kan tyde på at UGT1A4 ikke bidrar til glukuronidering av NDTAM. I en tidligere studie er det påvist at UGT1A4 ikke har enzymatisk aktivitet i forhold til 4OH-NDTAM [43] og det ble da spekulert i at det skyldtes demetyleringen av det elektrofile N-atomet. Dersom antagelsen er riktig burde UGT1A4 heller ikke ha noen aktivitet overfor NDTAM. Observasjonene i denne studien kan tyde på at UGT1A4 ikke har noen aktivitet overfor NDTAM og det kan derfor virke som om antagelsen om at demetyleringen av det elektrofile N-atomet hindrer N-glukuronidering også gjelder for NDTAM. For NDDTAM er det en svak tendens til at serumkonsentrasjonen er lavere for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 enn for gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. En forklaring er at det skyldes tilfeldig variasjon eller en ukjent faktor som innvirker på serumkonsentrasjonen, men det kan også tenkes at det skyldes UGT1A4 glukuronidering av NDDTAM. Spekulasjonene omkring substrat spesifisitet for UGT1A4 i forhold til tamoxifen metabolittene TAMNox, NDTAM og NDDTAM er gjort på grunnlag av et begrenset datamateriale og usignifikante trender. Det vil derfor være nødvendig med enzymatiske in vitro studier for å undersøke hvorvidt noen av spekulasjonene stemmer.

I tillegg til å se på serumkonsentrasjonene ble ratioene mellom serumkonsentrasjonene for tamoxifen, 4OHTAM, NDTAM, NDDTAM og 4OH-NDTAM undersøkt. Sammenhengen mellom NDTAM/TAM ratioen og UGT1A4 alleletype er det eneste signifikante resultatet fra den statistiske analysen. Denne ratioforskjelellen vil derfor bli diskutert, mens de andre ratioene som stemmer overens med de observerte serumkonsentrasjonene ikke vil bli

diskutert. Pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 har en økt NDTAM/TAM ratio i forhold til gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. Den økte ratioen er forventet ut i fra resultatene for serumkonsentrasjonene. Tamoxifenkonsentrasjonen er lavere for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 enn for gruppen som er homozygot for UGT1A4*1, mens NDTAM konsentrasjonen er tilnærmet lik for de to gruppene. Derfor er det som forventet at NDTAM/TAM ratioen er høyere for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 enn for gruppen som er homozygot for UGT1A4*1. Økningen i ratio og resultatene for serumkonsentrasjonene av NDTAM og tamoxifen tyder på at UGT1A4 N-glukuronidering er viktig for tamoxifen og mindre viktig eller uviktig for NDTAM. Det vil si at resultatet for NDTAM/TAM ratioen passer med antagelsen om at pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 har økt enzymatisk aktivitet ved glukuronidering av tamoxifen i forhold til gruppen som er homozygot for UGT1A4*1.

I resultatene er det kun for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3 det er mulig å se en trend i forhold til referansegruppen. Gruppen som er heterozygot har et videre konfidensintervall og en gjennomsnittsverdi som ligger nærmere referansegruppen. For den heterozygote gruppen kan det være UGT1A4 enzymer som er laget både fra UGT1A4*1 og UGT1A4*3 allelen. Dermed vil den heterozygote gruppen ha UGT1A4 enzymer med både høy og vanlig aktivitet i forhold til N-glukuronidering. Det kan tenkes at reguleringen av genekspresjon har innvirkning på hvilken allel som blir hyppigst brukt ved transkripsjon. Dermed vil begge UGT1A4 variantene og varierende mengder av den enkelte variant være tilstede hos den heterozygote gruppen. Større variasjon i enzymatisk aktivitet forklarer hvorfor den heterozygote gruppen har et videre konfidensintervall enn referansegruppen. Ved tilstedeværelse av begge enzymvariantene vil betydningen av ulik enzymatisk aktivitet bli mindre og det forklarer hvorfor resultatene for den heterozygote gruppen ligner mer på referansegruppen enn på resultatene for pasientprøven som er homozygot for UGT1A4*3.

Andre faktorer som kosthold og samtidig bruk av andre legemidler kan påvirke enzymatisk aktivitet og dermed metabolismen av tamoxifen. Det er tidligere påvist at pasienter som får tamoxifenbehandling ofte tar en rekke andre legemidler som er kjent for å påvirke legemiddelmetaboliserende enzymer [54], og det samme er trolig tilfelle for dette utvalget. Faktorer som kosthold og samtidig bruk av andre legemidler kan øke den interindividuelle variasjonen og redusere effekten av UGT1A4 allele type.

Mangelen på statistisk signifikante resultater kan forklares på tre måter. For det første er det en rekke andre enzymer som bidrar til fase I og fase II metabolisme av tamoxifen. Andre ruter for metabolisme av tamoxifen og metabolitter enn UGT1A4 katalysert N-glukuronidering kan

dermed maskere effekten av UGT1A4 allele type. Et annet forhold er at det kun var en pasientprøve som var homozygot for UGT1A4*3. De beskrevne tendensene for serumkonsentrasjonen og ratioene blir derfor å betrakte som en kasusbeskrivelse. Dersom det skal være mulig å vurdere effekten av UGT1A4*3 allelen med en rimelig grad av statistisk styrke trengs det mange flere pasientprøver som er homozygote for UGT1A4*3 allelen.

8. Konklusjon

Denne masteroppgaven har fokusert på de to UGT enzymene UGT1A4 og UGT2B15 som begge deltar i fase II metabolismen av tamoxifen og metabolitter. UGT1A4 N-glukuroniderer tamoxifen og 4OHTAM mens UGT2B15 glukuroniderer 4OHTAM og 4OH-NDTAM.

For hvert av de to enzymene har det vært en tredelt målsetning. Den første målsetningen har vært å etablere en real time PCR metode for å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen 142 T>G i UGT1A4 genet og en tilsvarende real time PCR metode for å identifisere enkelt nukleotidpolymorfismen 253 G>T i UGT2B15 genet. I tidligere studier er det vist at enkelt nukleotidpolymorfismen UGT1A4^{142 T>G} øker den enzymatiske aktiviteten til UGT1A4 ved glukuronidering av tamoxifen og 4OHTAM. For UGT2B15^{253 G>T} polymorfismen er det rapportert at UGT2B25*2 (253 T) har høyere enzymatisk aktivitet ved glukuronidering av androgener enn UGT2B15*1 (253 G). Andre del av målsetningen med masteroppgaven var å kartlegge fordelingen av UGT1A4 og UGT2B15 alleltypene i et utvalg av pasientprøver. Tredje og siste del av målsetningen var å undersøke om det er noen sammenheng mellom alleltype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter. Serumkonsentrasjonene er målt i en tidligere studie og blir brukt som en indikator på effekten av polymorfismene på adjuvant tamoxifen behandling.

Forsøkene med en real time PCR metode for UGT1A4 har vist at det er mulig å skille mellom UGT1A4 med og uten polymorfismen 142 T>G ved hjelp av smeltekurveanalyse av resultatene fra real time PCR. Den etablerte real time PCR metoden ble brukt til å kartlegge fordelingen av UGT1A4^{142 T>G} polymorfismen i et utvalg av pasientprøver. Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant sammenheng mellom UGT1A4 genotype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter. Resultatene motstrider allikevel ikke hypotesen om at variabel enzymatisk aktivitet av UGT1A4 kan påvirke serumkonsentrasjonen av tamoxifen og metabolitter.

Det har blitt foretatt en rekke forsøk med UGT2B15 uten at det har latt seg gjøre å etablere en real time PCR metode. Hovedproblemet har vært å få til spesifikk amplifikasjon av UGT2B15. På grunn av 95 % likhet i sekvensen mellom UGT2B15 og UGT2B17 har UGT2B15 primerene hybridisert med sekvenser i begge genene og gitt dobbel amplifikasjon. Det er vist at en alternativ måte å identifisere UGT2B15 253 G>T polymorfismen er amplifikasjon med PCR og sekvensering. Tidsbegrensningen for gjennomføringen av

masteroppgaven gjorde at det ikke var mulig å bruke mer tid på å kartlegge fordelingen av UGT2B15^{253 G>T} polymorfismen i utvalget.

9. Forslag til framtidig forskning

Forskning på tamoxifen og konjugeringsreaksjoner katalysert av UGT-enzymmer er vide og omfattende forskningsfelt. Derfor er forslagene til videre forskning avgrenset til temaer som angår UGT-glukuronidering av tamoxifen og metabolitter. Videre forskning på UGT1A4 sin rolle ved glukuronidering, UGT2B15 sin rolle ved glukuronidering og den generelle betydningen av glukuronidering i fase II metabolismen av tamoxifen og metabolitter er de tre temaene som blir tatt opp.

I kartleggingen av alleltype for UGT1A4 i prøvematerialet ble det bare funnet en pasientprøve som var homozygot for den interessante alleltypen UGT1A4*3 og utvalget av heterozygote pasientprøver var relativt lite (19 prøver). Det ble heller ikke funnet noen statistisk signifikant sammenheng mellom alleltype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter. Begrensningene i et så lavt antall av interessante alleltyper gjør at det ikke er mulig å trekke noen sikre konklusjoner for om UGT1A4 alleltype påvirker serumkonsentrasjonene av tamoxifen og metabolitter. Det vil derfor være interessant å utføre den samme type studie igjen på et større utvalg. Før igangsetting av en slik studie bør det foretas beregninger for hvor stort utvalget må være for å få tilstrekkelig mange pasientprøver som er homozygote og heterozygote for UGT1A4*3 til å trekke sikre konklusjoner for betydningen av UGT1A4 alleltype. I forbindelse med en slik studie vil det også være naturlig å planlegge andre studier som kan gjennomføres på det samme prøvematerialet.

I forhold til den enzymatiske aktiviteten til UGT1A4 vil det også være av interesse å få gjennomført studier av enzymatisk aktivitet i forhold til metabolittene TAMNox, NDTAM og NDDTAM. En slik studie vil kunne brukes til å bekrefte eller avkrefte spekulasjonene om aktivitet i forhold til TAMNox og NDDTAM, og spekulasjonen om fravær av aktivitet i forhold til NDTAM. I forkant av en slik studie kan det være aktuelt å få en medisinsk-organisk kjemiker til å vurdere de fysikalsk-kjemiske egenskapene til NDTAM, NDDTAM og 4OH-NDTAM og TAMNox i forhold til konjugeringsreaksjoner med N-atomet.

Forslagene til videre forskning på UGT2B15 vil i praksis innebære å fullføre arbeidet som har blitt påbegynt med UGT2B15 i løpet av denne studien. Det vil være interessant i forhold til videre forskning å få etablert en real time PCR metode for identifisering av enkelt nukleotidpolymorfismen 253 G>T. For å få til en slik real time PCR metode kan det være aktuelt å få designet og syntetisert nye primere for å oppnå spesifikk amplifikasjon av UGT2B15. I en eventuell prosess med design av nye UGT2B15 primere vil det være viktig å

ta hensyn til at det er 95 % sekvenslikhet mellom UGT2B15 og UGT2B17. Det vil også være naturlig å undersøke litteraturen for å sammenligne primere som har blitt brukt til amplifikasjon av UGT2B15 tidligere med UGT2B15 og UGT2B17 sekvensene og med primerene som har blitt brukt i denne studien. En annen mulig strategi for å få spesifikk amplifikasjon av UGT2B15 vil være å amplifisere et videre område rundt UGT2B15 i en initiell PCR prosess for deretter amplifisere og undersøke bare det interessante området ved hjelp av PCR.

Kartlegging av UGT2B15 allelfordeling i prøvematerialet ved hjelp av en etablert real time PCR metode eller en alternativ metode som for eksempel sekvensering er en naturlig fortsettelse av denne studien. Deretter kan det foretas en statistisk analyse for å undersøke om det er noen sammenheng mellom UGT2B15 allel type og serumkonsentrasjonene av tamoxifen og metabolitter.

Generelt er det to områder for videre forskning på glukuronidering av tamoxifen og metabolitter som er interessante. For det første vil det være interessant å undersøke om noen av de andre UGT-enzymene som deltar i glukuronideringen av de farmakologisk aktive metabolittene 4OHTAM og 4OH-NDTAM, har polymorfismer som kan ha betydning for den enzymatiske aktiviteten. Det første trinnet i et slikt forskningsprosjekt vil være å lete i litteraturen etter beskrivelser av polymorfismer i aktuelle UGT-enzymmer, som for eksempel UGT2B7 og UGT1A10, som kan ha betydning for den enzymatiske aktiviteten. Det neste trinnet vil være å enten utføre enzymatiske undersøkelser i forhold til de aktuelle substratene. En alternativ eller videre måte å undersøke en slik sammenheng på vil være å kartlegge allelfordelingen i et prøvemateriale og undersøke om det er noen sammenheng mellom alleltype og serumkonsentrasjon av tamoxifen og metabolitter.

Det andre interessante området for videre forskning er å undersøke UGT aktivitet i forhold til NDTAM, NDDTAM og TAMNox av et bredest mulig utvalg av UGT-enzymmer.

10. Referanser

1. Graham, P.L., *An introduction to Medicinal Chemistry Second edition*. Oxford University Press. 2001.
2. King, F.D., *Medicinal Chemistry Principles and Practice*, ed. K. F.D. 2002: Royal Society of Chemistry.
3. Rang H.P. , D.M.M., Ritter J.M. , Moore P.K., *Pharmacology Fifthe Edition*. 2003: Churchill Livingstone.
4. Mackenzie, P.I., et al., *Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(10): p. 677-85.
5. Mackenzie, P.I., et al., *The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence*. Pharmacogenetics, 1997. **7**(4): p. 255-69.
6. Mackenzie, P., J.M. Little, and A. Radominska-Pandya, *Glucosidation of hyodeoxycholic acid by UDP-glucuronosyltransferase 2B7*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(3): p. 417-21.
7. Senafi, S.B., D.J. Clarke, and B. Burchell, *Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation*. Biochem J, 1994. **303** (Pt 1): p. 233-40.
8. Bock, K.W., *Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(5): p. 691-6.
9. Radominska-Pandya, A., et al., *Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases*. Drug Metab Rev, 1999. **31**(4): p. 817-99.
10. Tukey, R.H. and C.P. Strassburg, *Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 581-616.
11. Krefregisteret, *Cancer in Norway*. 2005.
12. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.
13. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 1998. **351**(9114): p. 1451-67.
14. Howell, A., S.J. Howell, and D.G. Evans, *New approaches to the endocrine prevention and treatment of breast cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2003. **52 Suppl 1**: p. S39-44.
15. Osborne, C.K., *Tamoxifen in the treatment of breast cancer*. N Engl J Med, 1998. **339**(22): p. 1609-18.
16. Ali, S. and R.C. Coombes, *Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(2): p. 101-12.
17. Deroo, B.J. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 561-70.
18. van Leeuwen, F.E., et al., *Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer*. Lancet, 1994. **343**(8895): p. 448-52.

19. Meier, C.R. and H. Jick, *Tamoxifen and risk of idiopathic venous thromboembolism*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **45**(6): p. 608-12.
20. McDonald, C.C. and H.J. Stewart, *Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee*. Bmj, 1991. **303**(6800): p. 435-7.
21. Resch, A., et al., *Evidence that tamoxifen preserves bone density in late postmenopausal women with breast cancer*. Acta Oncol, 1998. **37**(7-8): p. 661-4.
22. Rutqvist, L.E. and A. Mattsson, *Cardiac and thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of adjuvant tamoxifen. The Stockholm Breast Cancer Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1398-406.
23. Turken, S., et al., *Effects of tamoxifen on spinal bone density in women with breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(14): p. 1086-8.
24. Desta, Z., et al., *Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(3): p. 1062-75.
25. Nowell, S., et al., *Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(21): p. 1635-40.
26. Nowell, S.A., et al., *Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **91**(3): p. 249-58.
27. Wegman, P., et al., *Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(1): p. R7.
28. Zheng, Y., et al., *Elimination of antiestrogenic effects of active tamoxifen metabolites by glucuronidation*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(10): p. 1942-8.
29. Adam, H.K., J.S. Patterson, and J.V. Kemp, *Studies on the metabolism and pharmacokinetics of tamoxifen in normal volunteers*. Cancer Treat Rep, 1980. **64**(6-7): p. 761-4.
30. Fromson, J.M., S. Pearson, and S. Bramah, *The metabolism of tamoxifen (I.C.I. 46,474). II. In female patients*. Xenobiotica, 1973. **3**(11): p. 711-4.
31. Fromson, J.M., S. Pearson, and S. Bramah, *The metabolism of tamoxifen (I.C.I. 46,474). I. In laboratory animals*. Xenobiotica, 1973. **3**(11): p. 693-709.
32. Lien, E.A., et al., *Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment*. Cancer Res, 1989. **49**(8): p. 2175-83.
33. Lien, E.A., E. Solheim, and P.M. Ueland, *Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4837-44.
34. Stearns, V., et al., *Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(23): p. 1758-64.
35. Coller, J.K., et al., *The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver*. Br J Clin Pharmacol, 2002. **54**(2): p. 157-67.
36. Crewe, H.K., et al., *Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes*. Biochem Pharmacol, 1997. **53**(2): p. 171-8.

37. Crewe, H.K., et al., *Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(8): p. 869-74.
38. Dehal, S.S. and D. Kupfer, *CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3402-6.
39. Gjerde, J., et al., *Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism*. Ann Oncol, 2008. **19**(1): p. 56-61.
40. Kaku, T., et al., *Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(11): p. 2093-102.
41. Ogura, K., et al., *Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(9): p. 1358-69.
42. Sun, D., et al., *Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. R50.
43. Sun, D., et al., *Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(11): p. 2006-14.
44. Coezy, E., J.L. Borgna, and H. Rochefort, *Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth*. Cancer Res, 1982. **42**(1): p. 317-23.
45. Johnson, M.D., et al., *Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **85**(2): p. 151-9.
46. Katzenellenbogen, B.S., et al., *Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells*. Cancer Res, 1984. **44**(1): p. 112-9.
47. Lim, Y.C., et al., *Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen*. Cancer Chemother Pharmacol, 2005. **55**(5): p. 471-8.
48. Tukker, J.J., M.A. Blankenstein, and J.W. Nortier, *Comparison of bioavailability in man of tamoxifen after oral and rectal administration*. J Pharm Pharmacol, 1986. **38**(12): p. 888-92.
49. Patterson, J.S., et al., *Serum concentrations of tamoxifen and major metabolite during long-term nolvadex therapy, correlated with clinical response*. Eur J Cancer, 1980. **Suppl 1**: p. 89-92.
50. Statens-Legemiddelverk, *Tamoxifen Merck NM Summary of Product Characteristics*. 2005: Statens Legemiddelverk.
51. Statens-Legemiddelverk, *Nolvadex Summary of Product Characteristics*. 2006: Statens Legemiddelverk.
52. Langan-Fahey, S.M., D.C. Tormey, and V.C. Jordan, *Tamoxifen metabolites in patients on long-term adjuvant therapy for breast cancer*. Eur J Cancer, 1990. **26**(8): p. 883-8.
53. Decensi, A., et al., *A randomized trial of low-dose tamoxifen on breast cancer proliferation and blood estrogenic biomarkers*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(11): p. 779-90.
54. Kisanga, E.R., et al., *Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2336-43.

55. Lerner, L.J. and V.C. Jordan, *Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture*. Cancer Res, 1990. **50**(14): p. 4177-89.
56. Lonning, P.E., et al., *Clinical pharmacokinetics of endocrine agents used in advanced breast cancer*. Clin Pharmacokinet, 1992. **22**(5): p. 327-58.
57. Nishiyama, T., et al., *Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(10): p. 1817-30.
58. Jordan, V.C., et al., *Ligand interaction at the estrogen receptor to program antiestrogen action: a study with nonsteroidal compounds in vitro*. Endocrinology, 1988. **122**(4): p. 1449-54.
59. QIAGEN, *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*. 2003: QIAGEN.
60. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. 2003: W. H. Freeman and Company.
61. NanoDrop, *Spectrophotometer ND-1000 User's Manual*. 2006: NanoDrop Technologies.
62. Invitrogen, *Platinum PCR SuperMix High Fidelity*. 2002.
63. Hoffmann, M., J. Hurlbaeus, and C. Weilke, *High-resolution melting curve analysis on the LightCycler (R) 480 PCR system*. Nature Methods, 2007: p. An17-An18.
64. Roche, *LightCycler 480 Genotyping Master*. 2006.
65. Roche, *LightCycler 480 Instrument Operator's Manual*. 2006.
66. QIAGEN, *QIAquick Spin Handbook*. 2006(2006 November).
67. Seqlab, *BIG-DYE VERSION 3.1 SEQUENCING PROTOCOL*. 2007.
68. Gjerde, J., et al., *Identification and quantification of tamoxifen and four metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2005. **1082**(1): p. 6-14.
69. Ehmer, U., et al., *Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 970-7.
70. 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.
71. 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.
72. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-7.
73. Mackay, I.M., *Real-time PCR in the microbiology laboratory*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(3): p. 190-212.
74. Bustin, S.A., *Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(4): p. 493-8.
75. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
76. Mattarucchi, E., et al., *Different real time PCR approaches for the fine quantification of SNP's alleles in DNA pools: assays development, characterization and pre-validation*. J Biochem Mol Biol, 2005. **38**(5): p. 555-62.
77. Mhlanga, M.M. and L. Malmberg, *Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR*. Methods, 2001. **25**(4): p. 463-71.
78. Saeki, M., et al., *Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population*. Drug Metab Pharmacokinet, 2005. **20**(2): p. 144-51.

79. Wiener, D., et al., *Correlation between UDP-glucuronosyltransferase genotypes and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone glucuronidation phenotype in human liver microsomes*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 1190-6.
80. Chen, F., et al., *Characterization of a cloned human dihydrotestosterone/androstanediol UDP-glucuronosyltransferase and its comparison to other steroid isoforms*. *Biochemistry*, 1993. **32**(40): p. 10648-57.
81. Court, M.H., et al., *UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **310**(2): p. 656-65.
82. Iida, A., et al., *Catalog of 86 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in three uridine diphosphate glycosyltransferase genes: UGT2A1, UGT2B15, and UGT8*. *J Hum Genet*, 2002. **47**(10): p. 505-10.
83. Levesque, E., et al., *Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene*. *Pharmacogenetics*, 1997. **7**(4): p. 317-25.
84. Tomboc, M. and S.F. Witchel, *Frequencies of the D85 and Y85 variants of UGT2B15 in children and adolescent girls with hyperandrogenism*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2003. **16**(5): p. 719-26.
85. Beaulieu, M., et al., *Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(37): p. 22855-62.
86. Berkhout, M., et al., *Detoxification enzyme polymorphisms are not involved in duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis*. *Br J Surg*, 2008. **95**(4): p. 499-505.