

Hovedfagsoppgave i farmakologi

Ekspresjon av IMPDH type I og II i retikulocytter
hos nyretransplanterte under mykofenolatbehandling

Ingrid Rasmussen



Utført ved
Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi
Avdeling for Medisinsk Biokjemi
Rikshospitalet Universitetssykehus

Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet
Universitetet i Oslo

Høsten 2005

FORORD

Denne hovedfagsoppgaven er en del av et større prosjekt som omhandler individuell farmakologisk monitorering av mykofenolat hos transplanterte. Dr.philos. Stein Bergan ved Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi, Avdeling for Medisinsk Biokjemi, Rikshospitalet Universitetssykehus har vært hovedveileder. Arbeidet med oppgaven startet i november 2004 og ble avsluttet i oktober 2005.

Jeg ønsker å rette en særlig stor takk til Stein Bergan for inspirerende og faglig målrettet veiledning. Med en utrolig evne til å lære bort, sitt gode humør og sin positive innstilling har han gjort hovedfagsåret til et spennende, lærerikt og trivelig år. Stein har dessuten lagt ned mye arbeid i organisering av pasientstudien slik at denne har vært mulig å gjennomføre.

Jeg vil takke dr.med. Helge Rootwelt for hjelp med den skriftlige utformingen av oppgaven og tolking av pasientresultater, og dessuten for engasjement og positiv innstilling. Pasientstudien er gjennomført i samarbeid med stipendiat Sara Bremer, som også har utviklet analysemetoden vi har benyttet i studien. Takk til Sara for godt samarbeid, opplæring i metoder og mange nyttige faglige innspill underveis. Jeg vil også takke stipendiatene Randeep Mandla og Nils Tore Vethe for stor hjelp med håndtering av pasientprøver. De tre stipendiatene har skapt et hyggelig sosialt miljø i gruppa.

Anders Åsberg, 1.amanuensis ved Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap, Farmasøytisk Institutt i Oslo har vært intern veileder, og jeg vil takke han for tilrettelegging og interesse for hovedfagsarbeidet.

En takk rettes til bioingeniørene på Farm/Endo, under ledelse av Laila Gjerdalen, for et trivelig arbeidsmiljø og for hjelp med blodprøvetaking til prosjektet. En ekstra stor takk til Thai Tran som alltid har vært positiv og stilt opp for å ”stikke” utallige ganger.

Jeg vil også takke familien min for oppmuntring gjennom hele dette året. En spesiell takk til Sigurd for støtte og omtanke, og for at han hele tiden har vært interessert i arbeidet mitt.

Oslo, oktober 2005

INNHold

| | |
|--|------------|
| FORKORTELSER..... | V |
| SAMMENDRAG | VII |
| 1 INNLEDNING | 1 |
| 1.1 TRANSPLANTASJON | 1 |
| 1.2 FORLIKELIGHET MELLOM DONOR OG RESIPIENT..... | 1 |
| 1.3 REJEKSJON..... | 2 |
| 1.4 IMMUNSUPPRESSIV BEHANDLING..... | 3 |
| 1.5 MYKOFENOLAT..... | 4 |
| 1.5.1 Farmakokinetikk..... | 4 |
| 1.5.2 Farmakodynamikk..... | 6 |
| 1.5.3 Isoformer av IMPDH..... | 6 |
| 1.6 FARMAKOLOGISK LEGEMIDDELMONITORERING..... | 7 |
| 1.7 INDIVIDUELL IMMUNMODULERING – MYKOFENOLAT OG IMPDH HOS TRANSPLANTERTE; BAKGRUNN | 8 |
| 1.8 RETIKULOCYTTER..... | 9 |
| 1.9 ISOLERING AV RETIKULOCYTTER | 10 |
| 1.9.1 Immunomagnetisk metode | 10 |
| 1.9.2 Fjerning av leukocytter..... | 10 |
| 2 PROBLEMSTILLING..... | 12 |
| 3 MATERIALE OG METODER..... | 13 |
| 3.1 REAGENSER | 13 |
| 3.2 UTSTYR | 14 |
| 3.3 METODEUTVIKLING – ISOLERING AV RETIKULOCYTTER FRA FULLBLOD | 15 |
| 3.3.1 Prøvemateriale..... | 15 |
| 3.3.2 Isolering med paramagnetiske kuler..... | 15 |
| 3.3.3 Filtrering på cellulosekolonne..... | 15 |
| 3.3.4 Kombinasjon av filtrering og isolering med paramagnetiske kuler..... | 16 |
| 3.3.5 Tilpasning av utstyr | 17 |
| 3.3.6 Validering av metode | 17 |
| 3.4 PASIENTSTUDIE – EKSPRESJONSENDRINGER AV <i>IMPDH I</i> OG <i>II</i> HOS NYRETRANSPLANTERTE UNDER MYKOFENOLATBEHANDLING..... | 19 |
| 3.4.1 Pasienter | 19 |
| 3.4.2 Immunsuppressiv protokoll..... | 19 |
| 3.4.3 Prøvemateriale..... | 20 |
| 3.4.4 Prøvebearbeidelse..... | 20 |
| 3.4.5 Analyseprinsipp..... | 21 |
| 3.4.6 Isolering av total-RNA | 22 |
| 3.4.7 Revers transkripsjon..... | 22 |
| 3.4.8 Sanntids PCR..... | 22 |
| 3.4.9 Databehandling; relativ kvantifisering av ekspresjonen..... | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4.10 | Utvelgelse av prøver til analyse..... | 24 |
| 3.4.11 | Godkjenning av studien..... | 24 |
| 4 | RESULTATER..... | 25 |
| 4.1 | METODEUTVIKLING..... | 25 |
| 4.1.1 | Isolering med paramagnetiske kuler..... | 25 |
| 4.1.2 | Filtrering på cellulosekolonne..... | 25 |
| 4.1.3 | Kombinert filtrering og isolering med paramagnetiske kuler..... | 26 |
| 4.1.4 | Validering..... | 26 |
| 4.1.5 | Endelig isoleringsprosedyre..... | 30 |
| 4.2 | PASIENTSTUDIE..... | 31 |
| 4.2.1 | Ekspresjonsendringer hos nyretransplanterte under MPA-behandling..... | 32 |
| 4.2.2 | Ekspresjonsendringer hos nyretransplanterte som ikke fikk MPA-behandling..... | 33 |
| 4.2.3 | Ekspresjonsendringer under rejeksjonsbehandling..... | 38 |
| 4.2.4 | Ekspresjon i relasjon til IMPDH-aktivitet..... | 38 |
| 4.2.5 | Kvantitativt innhold av genspesifikt mRNA i retikulocytter i forhold til fullblodceller..... | 38 |
| 4.2.6 | Relativ kvantifisering ved hjelp av REST-384® i forhold til relativ kvantifisering ved hjelp av LightCycler RelQuant 1.01..... | 39 |
| 5 | DISKUSJON..... | 40 |
| 5.1 | METODEUTVIKLING..... | 40 |
| 5.2 | PASIENTSTUDIE..... | 44 |
| 5.2.1 | Om presentasjon av resultatene..... | 44 |
| 5.2.2 | Ekspresjonsendringer hos pasienter som fikk MPA..... | 44 |
| 5.2.3 | Ekspresjonsendringer hos pasienter som ikke fikk MPA..... | 45 |
| 5.2.4 | Ekspresjonsendringer ved rejeksjonsbehandling..... | 46 |
| 5.2.5 | Ekspresjon i relasjon til enzymaktivitet..... | 46 |
| 5.2.6 | Bruk av referansegener..... | 47 |
| 5.2.7 | Kvantitativ vurdering av genspesifikt mRNA-innhold i retikulocytter..... | 49 |
| 5.2.8 | Sammenheng mellom ekspresjonsendringer og MPA-behandling..... | 49 |
| 6 | KONKLUSJON..... | 50 |
| 7 | REFERANSER..... | 51 |
| | APPENDIKS..... | A |
| | ANALYSERESULTATER FRA PASIENTSTUDIEN..... | A |

FORKORTELSER

| | |
|--------------|--|
| AcMPAG | – MPA-acylglukuronid |
| <i>ALAS</i> | – genet som koder for 5-aminolevulinat-syntase |
| APC | – antigenpresenterende celler |
| AUC | – areal under kurven (integrasjon av plasmakonsentrasjon som funksjon av tid etter dosering) |
| C_0 | – konsentrasjon av legemiddel like før dose |
| C_2 | – konsentrasjon av legemiddel to timer etter dose |
| CD4 | – markør som hovedsakelig finnes i cellemembranen til T-hjelperceller |
| CD8 | – markør som hovedsakelig finnes i cellemembranen til T-dreperceller |
| CD71 | – transferrin-reseptor, markør for retikulocytter og enkelte aktiverte leukocytter |
| cDNA | – komplementært DNA (kopi-DNA komplementært til mRNA) |
| C_p | – crossing point (terskel for fluorescensøkning som angir påviselige mengder PCR-produkt ved sanntids kvantitativ PCR) |
| CV | – variasjonskoeffisient |
| DNA | – deoksyribonukleinsyre |
| g | – a) måleenhet for sentrifugalkraft b) gram Betydningen kommer klart fram av konteksten |
| <i>G6PDH</i> | – genet som koder for glukose-6-fosfat-dehydrogenase |
| HLA | – humant leukocytantigen |
| IgG | – immunglobulin G |
| IgG2b | – IgG av subtypen 2b |
| IL-2 | – interleukin-2 |
| IL-2R | – IL-2-reseptor |
| IMP | – inosin-5`-monofosfat |
| IMPDH | – inosin-5`-monofosfat-dehydrogenase (genprodukt) |
| <i>IMPDH</i> | – genet som koder for IMPDH |
| $MgCl_2$ | – magnesiumklorid |
| MHC | – major histocompatibility complex (artsuavhengig betegnelse på vevstypemolekyler) |

| | |
|-------------------|--|
| MMF | – mykofenolatmofetil |
| MPA | – mykofenolat (mykofenolsyre) |
| MPAG | – MPA-7-O-glukuronid |
| mRNA | – messenger RNA, budbringer-RNA |
| MS2-RNA | – RNA fra bakteriofagen MS2 |
| mTOR | – mammalian target of rapamycin |
| NaCl | – natriumklorid |
| PBS | – phosphate buffered saline |
| PCR | – polymerasekjedereaksjon |
| REST-384® | – Relative Expression Software Tool, verktøy brukt til beregning av relativ ekspresjon basert på data fra sanntids PCR |
| RNA | – Ribonukleinsyre |
| rpm | – rotations per minute (sentrifugeringshastighet) |
| RT | – revers transkripsjon |
| SD | – standardavvik |
| TCR | – T-cellereseptor |
| t_{maks} | – tid etter dosering hvor plasmakonsentrasjonen er maksimal |
| UDP | – uridindifosfat |
| XMP | – xantosin-5`-monofosfat |
| $\beta 2M$ | – genet som koder for β_2 -mikroglobulin |

SAMMENDRAG

Mykofenolatmofetil (MMF) benyttes i kombinasjon med andre immunsuppressive legemidler for å hindre avstøtningsreaksjon etter organtransplantasjon. MMF er et prodrug som etter peroralt inntak metaboliseres presystemisk til den aktive substansen mykofenolat (MPA). Legemidlet hemmer enzymet inosin-5'-monofosfat-dehydrogenase (IMPDH), som katalyserer det hastighetsregulerende trinnet i cellenes nysyntese av guaninnukleotider. Den kliniske immunsuppressive effekten skyldes trolig i hovedsak hemmet lymfocytproliferasjon. MMF doseres vanligvis i faste doser på 1 gram to ganger daglig, til tross for inter- og intraindividuelle variasjoner i farmakokinetikken.

En tidligere studie i samme prosjekt har vist at den basale aktiviteten av IMPDH i fullblod øker gradvis hos nyretransplanterte under MPA-behandling i løpet av de første ukene etter transplantasjonen. Til tross for denne økningen i basalaktivitet, hemmes aktiviteten tilnærmet fullstendig ved maksimalkonsentrasjon av MPA. Det finnes to isoformer av IMPDH; type I og type II. Enzymaktivitetsanalysen skiller ikke mellom de to isoformene. Det er av interesse å studere om økning i enzymaktivitet kan relateres til genekspresjon av *IMPDH I* og/eller *IMPDH II*. I den forbindelse ble det i forrige hovedfagsoppgave i prosjektet utviklet en metode for spesifikk kvantitativ analyse av mRNA for disse to genene ved hjelp av relativ sanntids kvantitativ RT-PCR.

Siden erythrocytter utgjør den største cellepopulasjonen i blod, vil enzymaktiviteten i fullblod i stor grad gjenspeile aktiviteten i erythrocyttene. For å kunne analysere endringer i ekspresjon av *IMPDH I* og *IMPDH II* i forstadier til erythrocyttene, ble det i dette delprosjektet utviklet en metode for isolering av retikulocyttter fra fullblod. Prinsippet for isoleringen er at kjerneholdige blodceller, det vil si leukocyttter, fjernes fra prøven ved filtrering gjennom en cellulosekolonne. Metoden er over 99 % effektiv i eliminering av leukocyttter, og den gir i gjennomsnitt 39 % utbytte av retikulocyttene.

Endringer i ekspresjon av *IMPDH I* og *IMPDH II* i retikulocyttter og fullblodceller ble undersøkt hos nyretransplanterte pasienter med levende organgiver. Retikulocyttter ble

isolert fra fullblod ved filtreringsmetoden. Ekspresjonen av målgenene ble relatert til tre referansegener og normalisert til en cDNA-kalibrator.

Til sammen 13 pasienter ble fulgt fra innkomst før transplantasjon til og med ca to uker etter. Av disse pasientene fikk 11 MPA som en del av den immunsuppressive behandlingen. Resultatene fra studien viser at det skjer endringer i ekspresjonen av begge målgenene, både i fullblodceller og i retikulocytter. Hos pasienter under MPA-behandling øker *IMPDH I*-ekspresjonen i starten av forløpet før den enten stabiliseres eller avtar noe. Ekspresjon av *IMPDH II* avtar til å begynne med før den oppreguleres noe eller stabiliseres utover i perioden. Retikulocytter har etter den initiale reduksjonen større relativ økning i ekspresjon av *IMPDH II* enn fullblod, og ender opp på et høyere nivå enn utgangsnivået før transplantasjon. Resultatene viser altså at det skjer endringer, men det er uklart om endringene kan relateres til MPA-behandlingen. Det skjer også endringer i ekspresjonen hos pasienter som ikke får MPA.

Pasientstudien kan bidra til økt forståelse av MPA sin farmakodynamikk. Prosjektet kan også få betydning for det videre arbeidet med å etablere en strategi for farmakologisk monitorering av MPA.

1 INNLEDNING

1.1 Transplantasjon

Transplantasjon er overføring av vev eller celler, mellom individer eller innen samme individ. Dersom en slik overføring skjer fra ett individ til et annet innen samme art, kalles det allogen transplantasjon. Transplantasjon mellom eneggede tvillinger betegnes syngen transplantasjon, og xenotransplantasjon er transplantasjon mellom individer av ulik art. Det kalles autotransplantasjon dersom vev eller celler flyttes fra ett sted til et annet innen samme individ (1,2).

Allogen organtransplantasjon benyttes som behandlingsform ved blant annet irreversibel hjerte-, lunge-, lever- eller nyresvikt. Nyretransplantasjon er den hyppigste formen for organtransplantasjon. Allerede i 1956 utførte Leif Efskind ved Kirurgisk avdeling A, Rikshospitalet i Oslo, den første nyretransplantasjonen i Norden. Dette skjedde bare to år etter at verdens første vellykkede nyretransplantasjon ble utført i Boston, USA. Rikshospitalet har siden 1983 fungert som nasjonalt senter for transplantasjonskirurgi (3).

Nyretransplantasjon er det eneste alternativet til dialyse ved kronisk, irreversibel nyresvikt. Hvert år får mellom 200 og 300 personer transplantert en nyre her i landet, og antallet er økende. Ved nyretransplantasjon kan organet komme fra enten levende eller avdød donor. Omtrent 40 % av nyrene som transplanteres i Norge kommer fra levende giver, ofte i nær familie med pasienten (3,4).

1.2 Forlikelighet mellom donor og resipient

Ved utredning for transplantasjon kartlegges en rekke parametere hos pasienten, blant annet blodtype og vevstyper. Vanligvis vil man prioritere forlikelighet mellom donor og resipient (mottaker) i blodtype etter ABO-systemet. Deretter vurderes grad av forlikelighet i vevstypeantigener. Pasienter som venter på nekronyre, det vil si nyre fra avdød giver, registreres i en ventelistedatabase.

I ABO-systemet klassifiseres blodtypen etter tilstedeværelse av blodtypeantigen A og B på celleoverflaten. Fra seks måneders alder dannes det antistoffer mot det eller de blodtypeantigen man mangler, uten forutgående eksponering. For eksempel har en person med blodtype A antigen A på sine erythrocytter og danner antistoffer mot antigen B. Blod av type O mangler begge antigenene, mens ved blodtype AB er begge antigenene tilstede.

Vevstypemolekylene hos mennesker kalles humant leukocytantigen (HLA). Den artsuavhengige betegnelsen er major histocompatibility complex (MHC). HLA-molekylene deles inn i to hovedtyper, HLA klasse I og II. HLA klasse I (A, B og C) finnes på overflaten av nesten alle kjerneholdige celler. De binder peptidfragmenter som stammer fra proteiner syntetisert i cytosol, transporterer dem til celleoverflaten og presenterer dem for CD8+ T-celler. HLA klasse II-molekylene (DR, DQ og DP) finnes normalt bare på monocytter, B-celler og dendrittiske celler. De kalles i et samlebegrep for antigenpresenterende celler (APC). Klasse II-molekylene binder peptider som stammer fra endocytterte proteiner, og presenterer disse for CD4+ T-celler. T-cellerreseptorene (TCR) vil ikke reagere med peptider uten at de er bundet til HLA-molekyler (1,2).

1.3 Rejeksjon

Immunsystemet i kroppen oppfatter et allotransplantat som fremmed, og setter i gang en immunologisk reaksjon for å destruere transplantatet. Avstøtningsreaksjonene kan inndeles i tre typer etter når de vanligvis oppstår. Hyperakutt rejeksjon skjer fra minutter til 24 timer etter transplantasjonen. Denne typen rejeksjon skyldes preformerte antistoffer hos pasienter som tidligere er sensibiliserte. Akutt rejeksjon oppstår vanligvis fra et par uker til måneder etter transplantasjon, og også år senere dersom den immunsuppressive behandlingen svikter. En akutt rejeksjon skyldes hovedsakelig aktiverte alloreaktive T-lymfocytter som reagerer med fremmede peptider/HLA-komplekser. Den tredje typen avstøtningsreaksjon kalles kronisk rejeksjon, og kan oppstå fra måneder til år etter transplantasjonen (1). Det er ikke avklart hvilke mekanismer som ligger bak kronisk rejeksjon, men en rekke forskjellige faktorer som

iskjemitid, akutte reaksjonsepisoder, HLA-uforlikelighet, etterlevelse til immunsuppressiv behandling og resipientens alder og rase spiller trolig inn (5).

1.4 Immunsuppressiv behandling

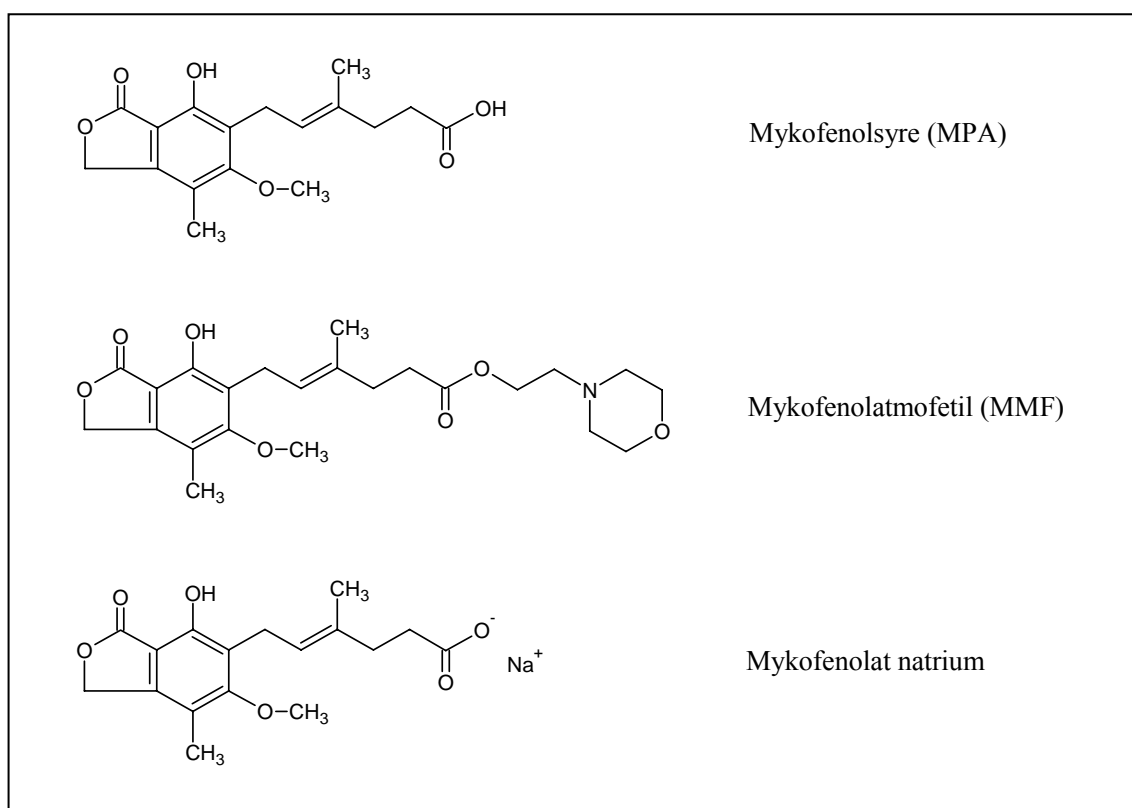
Etter allogen organtransplantasjon gis immunsuppressiv legemiddelbehandling for å hindre reaksjon. Denne behandlingen er helt nødvendig, og med de regimer som i dag brukes må behandlingen fortsette livet ut. Legemidlene gis i høye doser den første tiden. Deretter trappes dosene gradvis ned til et vedlikeholds nivå. Undertrykkelse av immunsystemet fører til at kroppen blir mer mottakelig for infeksjoner. Utvikling av kreft er også et problem ved immunsuppresjon. Det gjelder å finne en balansegang hvor immunsuppresjonen er sterk nok til å hindre akutt reaksjon, samtidig som behandlingen gir minst mulig risiko for infeksjoner, malignitet og andre medikamentelle bivirkninger.

Alle de immunsuppressive legemidlene som rutinemessig benyttes ved transplantasjon i dag virker hovedsakelig på T-cellene. Ciklosporin og takrolimus hemmer begge kalsineurin som deltar i signaloverføringen fra TCR til cellekjernen og bremser derved oppreguleringen av interleukin-2 (IL-2) og IL-2-reseptor (IL-2R). De antiproliferative substansene mykofenolat (MPA) og azatioprin (via metabolitter) virker på ulike måter forstyrrende på replikasjon av DNA. Sirolimus og everolimus hemmer mammalian target of rapamycin (mTOR) slik at signalet fra aktivert IL-2R om stimulering av T-celledeling blokkeres. Kortikosteroider utøver sin immundempende effekt på flere plan. I tillegg finnes både monoklonale og polyklonale antistoffer blant de immunsuppressive legemidlene (6,7).

Det benyttes gjerne en kombinasjon av flere immunsuppressive legemidler med ulike angrepspunkter og bivirkningsprofiler. Man kan dermed dra nytte av additive og synergistiske effekter slik at dosene av hvert enkelt medikament kan holdes lave (6). Et vanlig behandlingsregime ved nyretransplantasjon i Norge er kortikosteroider, ciklosporin og MPA (8).

1.5 Mykofenolat

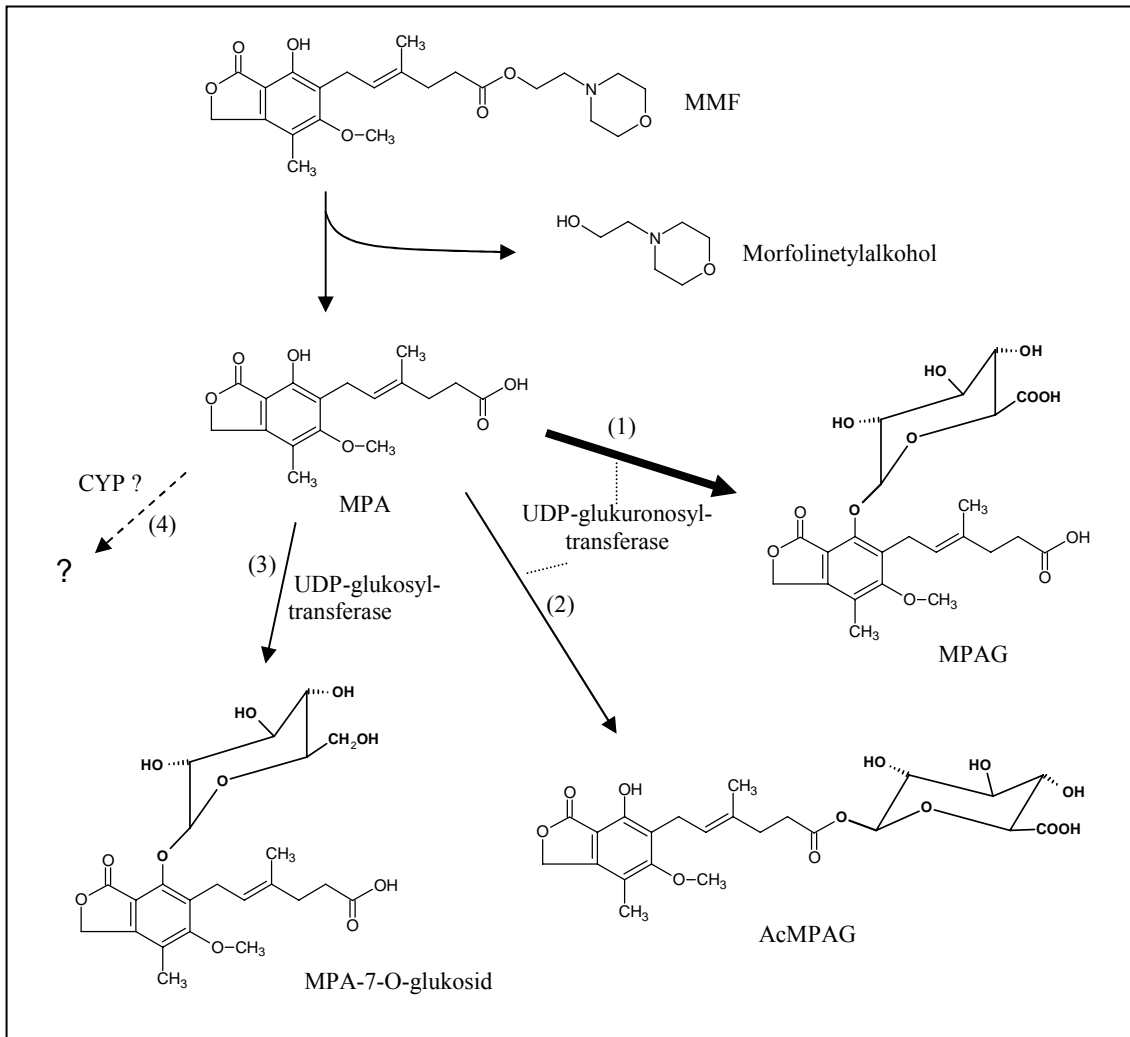
Mykofenolsyre (MPA) (Figur 1) er et av de immunsuppressive legemidlene som benyttes profylaktisk mot reaksjon etter transplantasjon av nyre, bukspyttkjertel, hjerte, lunge eller lever. Det kan også være et alternativ til konvensjonell behandling ved enkelte kroniske autoimmune sykdommer (9). Legemidlet er kommersielt tilgjengelig som prodrugesteren mykofenolatmofetil (MMF) i preparatet CellCept® (Roche). I de senere årene har det også kommet på markedet en enterodrasjert tablettformulering av mykofenolat natrium, markedsført under navnet Myfortic® (Novartis).



Figur 1: Strukturformler for mykofenolsyre, mykofenolatmofetil og mykofenolat natrium.

1.5.1 Farmakokinetikk

MMF er 2-morfolinetylesteren til MPA, og er i seg selv inaktiv. Ved peroral administrering gjennomgår molekylet presystemisk hydrolyse av esterbindingen til spaltningsproduktene MPA, som er den aktive substansen, og morfolinetylalkohol (Figur 2).



Figur 2: Mykofenolatmofetil (MMF) spaltes presystemisk til mykofenolat (MPA) og morfolinetylalkohol. Uridindifosfat (UDP)-glukuronosyl-transferase glukuroniderer MPA til MPA-7-O-glukuronid (MPAG) (nr.1) og MPA-acylglukuronid (AcMPAG) (nr.2). UDP-glukosyl-transferase glukosylerer MPA til MPA-7-O-glukosid (nr.3). I tillegg er det mulig at en fjerde metabolitt dannes via cytokrom P-450-systemet (nr.4).

Absorpsjonen skjer raskt og biotilgjengeligheten er høy, omkring 94 % (10). Maksimal plasmakonsentrasjon oppnås omtrent 1 time etter peroral administrering, og halveringstiden er 16-17 timer (10,11). Det kan observeres en sekundær topp i plasmakonsentrasjonen etter 8 til 12 timer. Denne skyldes at hovedmetabolitten MPA-7-O-glukuronid (MPAG) gjennomgår enterohepatisk resirkulering hvor den skilles ut i tarmen via gallen, spalter av glukuronid-delen, og reabsorberes som MPA (10). Mykofenolat har pKa-verdi 4,5 (12). Dette innebærer at molekylet i sirkulasjonen hovedsakelig finnes på deprotonert form, det vil si som mykofenolat. Både MPA og MPAG har høy proteinbindingsgrad, henholdsvis 97 og 82 % (11).

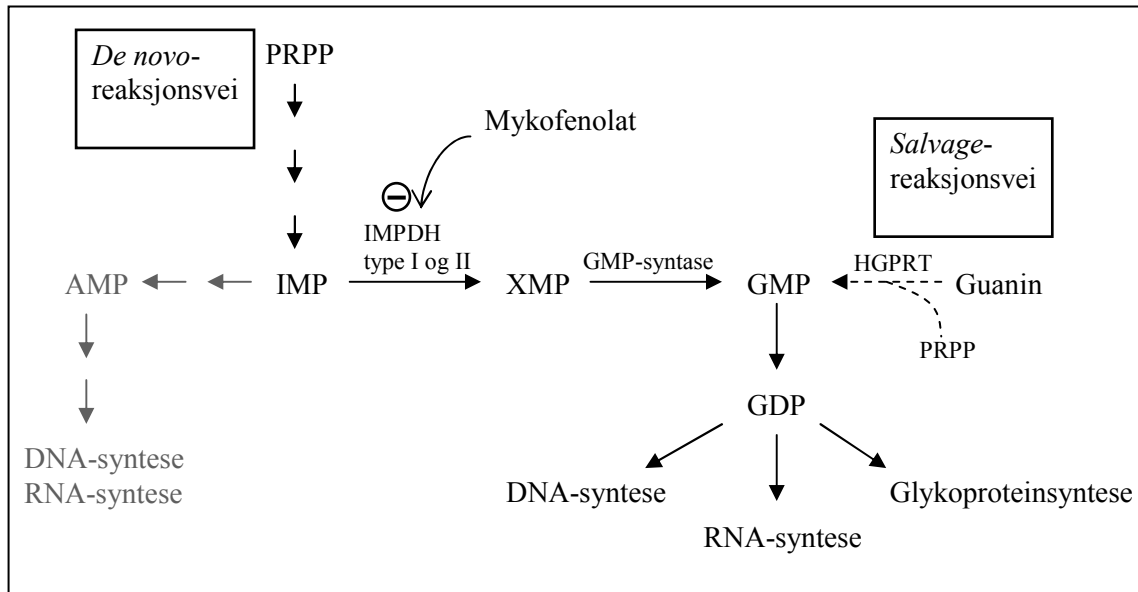
Tre metabolitter av MPA er strukturidentifisert (Figur 2). Hovedmetabolitten MPAG og MPA-acylglukuronid (AcMPAG) dannes begge ved hjelp av uridindifosfat (UDP)-glukuronosyl-transferase. Den tredje metabolitten, MPA-7-O-glukosid, dannes via UDP-glukosyl-transferase. Det er også holdepunkter for at det via cytokrom P450-systemet dannes en fjerde metabolitt (13,14). Hovedmetabolitten er inaktiv, men det er vist at AcMPAG har farmakologisk effekt (15). Over 90 % av tilført MMF elimineres i nyrene som MPAG (11).

1.5.2 Farmakodynamikk

Mykofenolat utøver sin immundempende effekt ved selektiv, reversibel, non-kompetitiv hemming av enzymet inosin-5`-monofosfat-dehydrogenase (IMPDH). IMPDH katalyserer oksidering av inosin-5`-monofosfat (IMP) til xantosin-5`-monofosfat (XMP) (Figur 3). Dette er det hastighetsregulerende trinnet i *de novo*-syntesen av guaninnukleotider. Guaninnukleotidene kan i de fleste celler også dannes via en annen reaksjonsvei, *salvage pathway*. I lymfocytter er imidlertid *salvage*-reaksjonsveien, som resirkulerer puriner, sannsynligvis ikke aktiv, dermed er disse cellene avhengige av *de novo*-reaksjonsveien for å produsere guaninnukleotider. MPA reduserer altså tilgangen på puriner, med en viss selektivitet i lymfocyttene. Dette hemmer replikasjon av DNA, noe som videre hemmer proliferasjon av aktiverte B- og T-lymfocytter (16).

1.5.3 Isoformer av IMPDH

Det er identifisert to isoformer av humant IMPDH; type I og II. De består begge av 514 aminosyrer og peptidsekvensene er 84 % identiske (17). Det hevdes at MPA gir fire til fem ganger mer potent hemming av IMPDH type II enn av type I (18).



Figur 3: Puriner syntetiseres via *de novo*-reaksjonsvei og resirkuleres via *salvage*-reaksjonsvei. Inosin-5'-monofosfat-dehydrogenase (IMPDH) type I og II katalyserer omdannelsen av IMP (inosin-5'-monofosfat) til xantosin-5'-monofosfat (XMP) i *de novo*-reaksjonsveien. Mykofenolat hemmer dette trinnet. PRPP = 5-fosforibosyl-1-pyrofosfat, AMP = adenosinmonofosfat, GMP = guanosinmonofosfat, GDP = guanosindifosfat, HGPRT = hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferase.

1.6 Farmakologisk legemiddelmonitorering

Farmakologisk monitorering benyttes for legemidler med smalt terapeutisk vindu, store variasjoner i farmakokinetiske eller -dynamiske forhold, og for legemidler med interaksjonsproblematikk. Behandlingen individualiseres ved å justere dosene i henhold til en målbar parameter. Ofte monitoreres total legemiddelkonsentrasjon i plasma eller fullblod på et gitt tidspunkt i doseintervallet, men andre parametere kan være bedre egnet for enkelte legemidler. Det må etableres et terapeutisk område for den målbare parameteren.

Behandlingsmålet ved immunsuppresjon er fravær av reaksjon. Dosene av immunsuppressive legemidler må tilpasses slik at effekten blir sterk nok, samtidig som risikoen for infeksjoner, neoplastisk sykdom og andre medikamentelle bivirkninger minimaliseres. Det er ikke alltid noen direkte sammenheng mellom administrert dose og farmakologisk effekt. Farmakologisk monitorering er et nyttig hjelpemiddel for å gi pasienter etter transplantasjon et balansert nivå av immunsuppresjon.

Mange av immunsuppressivene doseres etter farmakologisk monitorering. For MPA er det ikke etablert noe terapeutisk område, og det eller de optimale tidspunkt i doseringsintervallet for prøvetaking er ikke avklart. Areal under kurven (AUC) er trolig den parameteren som best kan relateres til klinisk effekt og bivirkninger. Monitorering av AUC er imidlertid vanskelig å få til i praksis. Målinger rett før inntak av dosen, C_0 -målinger, har vist seg å ha liten sammenheng med AUC. Ulike strategier for monitorering har vært diskutert, og blant annet forenklet AUC eller enkeltmålinger tidlig i doseringsintervallet er foreslått (19).

I flere studier har MMF vist betydelige variasjoner i kinetikken, både mellom pasienter og innen samme pasient. Anbefalt dosering på 1 g to ganger daglig er standard for de fleste voksne pasienter, men mye taler altså for at doseringen burde vært individuelt tilpasset hver enkelt pasient (19).

1.7 Individuell immunmodulering – mykofenolat og IMPDH hos transplanterte; bakgrunn

Dette delprosjektet inngår i et forskningsprosjekt innen individuell immunmodulering med særlig fokus på MPA. Et overordnet mål er å komme frem til en egnet strategi for farmakologisk monitorering av dette legemidlet. Forskningen kan bidra til redusert rejeksjonsfrekvens og reduksjon i antall seponeringer som skyldes bivirkninger.

En tidligere studie i prosjektet har vist en invers sammenheng mellom MPA-konsentrasjonen i plasma og IMPDH-aktivitet i fullblodceller. IMPDH-aktiviteten hemmes nesten fullstendig ved t_{maks} av MPA, og tar seg opp igjen i takt med at MPA-konsentrasjonen synker, slik at enzymaktiviteten er omtrent tilbake til utgangsnivået gjennom siste halvdel av doseintervallet (20). Samme studie viser også at det skjer en gradvis økning i basalaktiviteten av IMPDH i løpet av de første ukene av MPA-behandlingen. Likevel er MPA fortsatt i stand til å hemme enzymet nesten fullstendig ved t_{maks} .

Det er interessant å undersøke hva den økte basalaktiviteten skyldes, og i hvilke blodceller en eventuell enzyminduksjon skjer. En mulig hypotese er at enzymaktiviteten

reguleres på genekspresjonsnivå. I den forbindelse er det utviklet en metode for relativ kvantitativ ekspresjonsanalyse av *IMPDH* type *I* og *II*. Metoden kan benyttes til å undersøke ekspresjonsendringer i fullblodceller og i isolerte CD4⁺ celler. Foreløpige resultater fra et pilotprosjekt på nyretransplanterte pasienter kan tyde på at det skjer endringer i fullblodceller, men det trengs flere pasientresultater for å kunne trekke konklusjoner (21).

Siden de røde blodlegemene utgjør den desidert største populasjonen av celler i blodet, er det interessant å undersøke om den observerte endringen av *IMPDH*-aktivitet i fullblodceller skyldes endring av aktivitet i røde blodlegemer. Dette vil ha betydning for hvordan man skal tolke funnene i fullblodceller og for hvilke implikasjoner det kan få for dosering og monitorering. Siden modne røde blodlegemer ikke har proteinsyntese, er det ikke opplagt hvordan enzymaktiviteten eventuelt kan endres. En teori er at endringen skjer i umodne forstadier til erytrocytter. Dette kan passe med at økningen i enzymaktivitet foregår over uker etter oppstartet MPA-behandling etter hvert som nye erytrocytter modnes og frigis til sirkulasjonen der de lever i gjennomsnittlig 120 døgn. Dermed er det av stor interesse å undersøke *IMPDH*-ekspresjon i retikulocytter som nettopp er kommet ut i sirkulasjonen, spesielt i dagene rundt oppstart av MPA-behandling.

1.8 Retikulocytter

Retikulocytter er det siste av forstadiene til modne erytrocytter. Omtrent 1-2 % av de røde blodlegemene i sirkulasjonen er retikulocytter, og de igjen kan inndeles i ulike modningsstadier. Retikulocyttene modner til erytrocytter i løpet av omtrent ett døgn etter at de har forlatt beinmargen. De har ikke cellekjerne, men de utøver proteinsyntese med utgangspunkt i preformert mRNA. Innholdet av mRNA i retikulocyttene er dannet før cellene forlater beinmargen og mens de fortsatt har cellekjerne. Mengden mRNA reduseres gradvis ettersom retikulocyttene modner til erytrocytter (22,23).

På grunnlag av preformert mRNA i retikulocyttene kan det være mulig å studere ekspresjonsendringer i den røde blodcellerekken, men da må retikulocyttene først separeres fra de andre blodcellene. Mengden mRNA i hver retikulocytt er trolig svært

liten, med unntak av mRNA for hemoglobin. Etter prøvetaking blir dessuten intracellulært RNA ofte hurtig degradert av både spesifikke og uspesifikke endogene nukleaser. Ved isolering av celler utsettes RNA for ytterligere påvirkninger. Dette innebærer at retikulocyttene må isoleres raskt og skånsomt.

1.9 Isolering av retikulocytt

1.9.1 Immunomagnetisk metode

Det er beskrevet en metode for positiv isolering av retikulocytt ved hjelp av en immunomagnetisk teknikk. Metoden er basert på det retikulocyttspesifikke overflateprotein CD71, transferrin-reseptoren. Monodisperse paramagnetiske kuler (dynalkuler) dekket med monoklonale antistoffer spesifikke mot CD71-antigenet inkuberes med blodprøven. Kulene fester seg til CD71 på retikulocyttene. Når prøven etter inkubering plasseres på magnet, vil kulene med retikulocyttene bundet til seg immobiliseres mot magneten. Supernatanten suges av og kastes. Etter vasking med buffer, står man igjen med retikulocytt og kuler. Kulene kan fjernes ved hjelp av magnet etter lysing av cellene (24).

CD71 uttrykkes også på aktiverte leukocytt (25). For å hindre at kulene fester seg til leukocytt, blir leukocyttene fjernet før isolering av retikulocytt (24), se 1.9.2. Hos transplanterte pasienter kan fullblod inneholde flere aktiverte leukocytt enn hva som er normalt hos friske personer. Derfor er det ekstra viktig at leukocyttene fjernes før man isolerer retikulocytt ved hjelp av dynalkuler.

1.9.2 Fjerning av leukocytt

Alexander Fleming publiserte i 1926 en enkel metode for å fjerne leukocytt fra fullblod. Metoden går ut på å filtrere fullblod gjennom en plugg av bomull. Leukocyttene vil da sitte igjen i pluggen, og andre celler vil renne med væskestrømmen gjennom bomullen (26).

En modifisert versjon av Flemings metode ble publisert av Beutler *et al* i 1976. I stedet for bomull brukes to typer cellulose. Av like mengder mikrokrystallinsk cellulose og α -cellulose slemmet opp i NaCl 0,9 % lages en filterkolonne som blodprøven filtreres gjennom. Cellulosekolonnen fjerner 99,75 % av leukocytterne og mesteparten av trombocytterne, mens erytrocyttene vaskes ut. Metoden er uselektiv med hensyn på populasjonen av de røde blodcellene. Dette innebærer at relativt antall retikulocytter i forhold til erytrocytter er det samme før og etter filtrering (27).

Det er gjort en studie for å finne ut hvorfor cellulosen retarderer leukocytter og ikke erytrocytter. Resultatene viser at årsaken ligger i stivheten til cellene. Ettersom leukocytterne er stivere og mindre fleksible i formen enn erytrocyttene, fanges de mekanisk i cellulosekolonnen. Trombocytter fanges også i noen grad opp, men størrelsen gjør at denne celletypen renner lettere gjennom cellulosekolonnen enn leukocytterne (28).

2 PROBLEMSTILLING

Målsettingen med hovedfagsoppgaven var i første omgang å utvikle en metode for isolering av retikulocytter fra fullblodprøver. Bearbeidet prøvemateriale skulle være egnet for ekspresjonsanalyse ved metoden som er etablert ved laboratoriet (21).

Isoleringsmetoden skulle videre benyttes i en studie hvor ekspresjonsendringer av *IMPDH I* og *II* skulle studeres hos nyretransplanterte pasienter under MPA-behandling.

I studien skulle man ta for seg ekspresjonsendringer i retikulocytter og fullblodceller.

3 MATERIALE OG METODER

3.1 Reagenser

Reagenser som er brukt i laboratoriearbeid i forbindelse med denne oppgaven er oppgitt i Tabell 1.

Tabell 1: Reagenser

| REAGENS | PRODUSENT |
|--|---|
| Dynabeads® Pan Mouse IgG, 4.0x10 ⁸ kuler/ml | Dynal Biotech, Oslo, Norge |
| LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| LightCycler® h- <i>ALAS</i> Housekeeping Gene Set | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| LightCycler® h- <i>β2M</i> Housekeeping Gene Set | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| LightCycler® h- <i>G6PDH</i> Housekeeping Gene Set | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| Anti-Human CD71 (Mouse monoclonal IgG2b) | Diatec.com AS, Oslo, Norway |
| MS2 RNA 10 A ₂₆₀ units | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| PCR Nucleotide Mix | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) without Ca and Mg, BioWhittaker™, sterilfiltrert | Cambrex Bio Science, Verviers, Belgia |
| Primer random p(dN) ₆ 50 A ₂₆₀ units | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| Primere og prober | TIB® MOLBIOL, Berlin, Tyskland |
| Protector RNase Inhibitor | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| Sigmacell Cellulose, Type 50, part.str. 50 µm | Sigma-Aldrich, Inc, St.Louis, MO |
| Transcriptor Reverse Transcriptase | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| α-cellulose | Sigma-Aldrich, Inc, St.Louis, MO |

3.2 Utstyr

Tabell 2 inneholder en oversikt over utstyr som er brukt i forbindelse med denne oppgaven. I tillegg er det brukt standard laboratorieutstyr som pipetter, aerosolresistente pipettespisser med filter, sentrifuger og mikroskop med tilhørende utstyr.

Tabell 2: Utstyr

| UTSTYR | PRODUSENT |
|--|---|
| BD Plastipak™ 20 mL sterile sprøyter, Luer-Lok™ | Becton Dickinson, Drogheda, Irland |
| BD Vacutainer™ Z, 5 mL, rød kork (uten tilsetning) | BD Vacutainer Systems, Plymouth, England |
| BD Vacutainer™ EDTA K3E 15 %, lilla kork, ulike størrelser | BD Vacutainer Systems, Plymouth, England |
| Combi-Stopper | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Tyskland |
| Erlenmeyerkolber, 100 mL, med vid hals | Schott Duran Productions GmbH & Co. KG, Mainz, Tyskland |
| Celldyn 4000 | Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois |
| Coulter® Z2 Particle count & size analyzer | Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA |
| LightCycler® | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| LightCycler® Capillaries (20 µl) | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| MagNA Pure LC | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| MagNA Pure Disposable Plastics | Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland |
| Magnetic Particle Concentrator | Dynal Biotech, Oslo, Norge |
| Micro tubes 1,5 mL, PP, sterile | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland |
| MiniCycler™ Peltier Thermal Cycler | MJ Research, Waltham, MA |
| Multiply® -Pro cap 0,2 mL, PP, PCR-sertifisert | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland |
| PAXgene™ Blood RNA Tube | PreAnalytiX, Hombrechtikon, Sveits |
| Stativ til filtrering | Spesialtilpasset på laboratoriet |
| Whatman® qualitative filter paper, grade 1, diameter, 1,0 cm | Whatman International Ltd, Maidstone, England |
| Whatman® qualitative filter paper, grade 1, diameter, 1,5 cm | Whatman International Ltd, Maidstone, England |

3.3 Metodeutvikling – isolering av retikulocytter fra fullblod

3.3.1 Prøvemateriale

Det ble gjentatte ganger tatt blodprøver til metodeutviklingen av fem friske frivillige personer. Til valideringen ble det i tillegg tatt prøver av utvalgte pasienter med høye eller lave hematokritverdier. Standard venepunksjonsprosedyre ble benyttet, og prøvene ble tatt i EDTA-rør.

3.3.2 Isolering med paramagnetiske kuler

Det ble først forsøkt å isolere retikulocytter ved hjelp monodisperse paramagnetiske dynalkuler etter metoden beskrevet av Brun *et al* (24), med visse modifikasjoner. Kuler dekket med humane monoklonale antistoffer spesifikke mot Fc-regionen på immunglobulin G (IgG) fra mus ble inkubert med monoklonale museantistoffer, mot humant CD71, av typen IgG2b. Metoden for påkobling av antistoffer var basert på produsentens anvisning i pakningsvedlegg for kulene (29). Det ble brukt 0,1 mg antistoff per mL kulesuspensjon ($4,0 \times 10^8$ kuler). Inkuberingen foregikk på rulle med samtidig rotasjon og tilting, og varte i 20 minutter. Retikulocytter ble isolert fra fullblodprøver etter den publiserte isoleringsmetoden, men filtrering på cellulose ble foreløpig utelatt. Det ble testet ulike mengder kulesuspensjon for å finne frem til en optimal mengde. Inkubering ble forsøkt både kjølig og i romtemperatur, og det ble prøvd alternative inkuberingstider. For å se på utbyttet etter isoleringen, ble det foretatt celledelling på Coulter® partikkelteller og mikroskopering av utstryk farget med May-Grünwald/Giemsa. Det ble gjort ekspresjonsanalyse av enkelte prøver for å se om de inneholdt mRNA.

3.3.3 Filtrering på cellulosekolonne

Leukocytter ble forsøkt fjernet ved hjelp av en tilpasset versjon av den tidligere omtalte metoden til Beutler *et al* (27). Mikrokrystallinsk cellulose og α -cellulose i masseforhold 1:1 ble slemmet opp i fosfatbuffer (PBS) med pH 7,4. Mengden PBS i forhold til cellulose ble optimalisert ved at mengde og volum ble variert. Først ble

cellulosekolonner preparert i 5 mL engangssprøyter, men for å øke kapasiteten gikk man over til 20 mL engangssprøyter. Stempelet i sprøyta ble fjernet. Et filterpapir på størrelse med indre diameter i sprøyta ble fuktet og plassert i bunnen av sprøyta for å hindre cellulosen i å renne ut med væskestrømmen. Godt oppslemmet cellulose ble overført til sprøyta, som stod i et stativ over et oppsamlingskar. Etter at overflødig væske hadde rent ut, stod det igjen en kolonne av fuktig cellulose. Ferdig cellulosekolonne hadde en høyde på drøyt 1 cm, det vil si opp til 3 mL-streken i sprøyta. Fullblodprøven ble påsatt kolonnen dråpevis for at overflaten på kolonnen ikke skulle ødelegges. Deretter fikk blodet trekke fullstendig ned i cellulosen. Røde blodceller ble eluert ut med PBS. Ulike prøvevolumer, elueringsvolumer og antall elueringsporsjoner ble forsøkt. Utstryk av eluat ble mikroskopert for å undersøke tilstedeværelse av leukocytter. Filtreringsmetoden ble vurdert med hensyn på tidsbruk og tilstedeværelse av leukocytter i utstryk av eluat.

Tillaging av cellulosekolonner etter denne metoden tar mye tid. Derfor ble det undersøkt om cellulosekolonner som har vært lagret over natten eller over flere dager kan benyttes. Ved lagring ble sprøytespissen proppet og stempelåpningen ble tildekket med Parafilm®. Filtrering på nylagde og lagrede kolonner ble sammenlignet ved ekspresjonsanalyse.

3.3.4 Kombinasjon av filtrering og isolering med paramagnetiske kuler

Filtrering og isolering med paramagnetiske kuler ble kombinert, som beskrevet av Brun *et al* (24). Fullblod ble filtrert, og eluatet ble inkubert med kuler som var dekket med antistoff mot CD71. Ekspresjonsanalyse ble utført på prøvene etter isolering med ulike kombinasjoner av prøvevolum, elueringsvolum, antall elueringsporsjoner, mengde kuler og inkuberingstid. Tidsbruk i prøveopparbeidelsen, mikroskopering av utstryk og resultater fra ekspresjonsanalysen av prøvene ble vurdert.

Filtrering alene ble sammenlignet med kombinert filtrering og isolering med dynalkuler. Man så særlig på bruk av tid, og resultater fra ekspresjonsanalysen. Tidsbruk er viktig, fordi pågående degradering av RNA kan være et problem og representere en viktig faktor som påvirker resultatene (21,30).

3.3.5 *Tilpasning av utstyr*

Det ble gjort omfattende arbeid med tilpasning av utstyr for å kunne gjennomføre leukocyttfiltreringen rent praktisk. Ingen av de kommersielt tilgjengelige stativene passet til dette formålet, så mange provisoriske løsninger ble benyttet underveis. Det ble etter hvert konstruert et eget stativ med utgangspunkt i to vanlige laboratoriestativer i plast. Stativet ble spesialtilpasset filtrering i 20 mL sprøyter og oppsamling av eluat i 5 mL Vacutainer™-rør. Erlenmeyerkolber med vid hals ble benyttet ved innveining og oppslemming av cellulose.

3.3.6 *Validering av metode*

Den endelige metoden ble validert med hensyn på utbytte av retikulocytter og effektivitet i fjerning av leukocytter. Celletellinger ble gjennomført på Celldyn 4000. Dette er et apparat som benyttes i kliniske hematologiske analyser. Apparatet teller som standard alle typer blodceller, også retikulocytter.

Filterkolonner ble laget etter metodebeskrivelsen, se 3.4.4.1. Eluatet ble sentrifugert ved 209 g (1100 rpm) i 5 minutter, og supernatanten ble sugd av og kastet. Volum av cellepellet ble målt ved hjelp av pipette, og det ble tilsatt et beregnet restvolum PBS for å oppnå et bestemt totalvolum. Cellepelleten ble resuspendert og prøven ble analysert på Celldyn 4000 med retikulocytt-telling i tillegg til standard celletellinger. Samme hematologiske analyse ble foretatt på tilhørende fullblodprøve for å kunne beregne utbytte og effektivitet.

3.3.6.1 INNLEDENDE FORSØK

Et innledende forsøk til valideringen ble gjort for å finne et passende resultatvolum for resuspending av cellepellet. Seks identiske prøver ble filtrert på hver sin filterkolonne. Etter sentrifugering ble cellepellet resuspendert i ulike volumer PBS, slik at resultatvolumene ble fordelt mellom 700 og 2000 µL. Ut fra resultatene ble det valgt ut et passende volum som ga tilnærmet lik konsentrasjon erytrocytter som i den tilhørende fullblodprøven.

3.3.6.2 VARIASJON SOM FØLGE AV FILTERKOLONNENES HENSTANDSTID

Filterkolonner ble tillaget med etterfølgende henstand, i det ene forsøket fra 0 til 90 minutter og i det andre fra 0 til 60 minutter. For hvert av forsøkene ble identiske prøver filtrert på alle kolonnene, og én operatør gjorde alle arbeidsoperasjoner. Etter sentrifugering og resuspending til resultatvolum på 1000 µL, ble prøvene og tilhørende fullblodprøve analysert på Celldyn.

3.3.6.3 VARIASJON MELLOM OPERATØRER

Det ble gjort en test på variasjon mellom operatører. To ulike operatører lagde fem filterkolonner hver, fra hver sin porsjon innveid cellulose. Operatørene filtrerte identiske prøver på kolonnene, altså fem paralleller hver. Alle eluatene ble videre behandlet som beskrevet ovenfor, av én felles operatør, med et resultatvolum på 1000 µL etter sentrifugering og resuspending. Bearbeidede prøver og tilhørende fullblodprøve ble analysert på Celldyn.

3.3.6.4 VARIASJON MELLOM ULIKE PRØVER

Én operatør lagde 14 filterkolonner. Det ble tatt EDTA-prøver av to pasienter med lav hematokrit-verdi og en pasient med høy hematokrit, samt prøver fra tre friske frivillige. To paralleller fra hver prøve ble filtrert, sentrifugert og resuspendert av samme operatør. De bearbeidede prøvene og tilhørende fullblodprøver ble analysert på Celldyn.

3.4 Pasientstudie – ekspresjonsendringer av *IMPDH I* og *II* hos nyretransplanterte under mykofenolatbehandling

Det ble gjennomført en studie hvor ekspresjon av *IMPDH I* og *II* ble analysert hos nyretransplanterte pasienter før og under MPA-behandling.

3.4.1 Pasienter

Studien inkluderte pasienter som skulle nyretransplanteres med organ fra levende giver. Pasientene var over 18 år. Skriftlig, informert samtykke ble innhentet. Hver pasient ble fulgt fra minst to dager før transplantasjon og til og med ca to uker etter. Før transplantasjon ble det tatt prøver av pasienten ved innkomst til sykehuset, samt morgenprøve og ettermiddagsprøve dagen etter innkomst. Transplantasjonsdagen, som oftest var to dager etter innkomst, ble det ikke tatt prøver til studien. Første uke etter transplantasjon ble det samlet inn prøver daglig, med unntak av i helgen. Deretter ble det tatt prøver omkring dag ni, tolv og fjorten, slik at det til sammen ble åtte prøvetakingstidspunkter etter transplantasjon. Alle prøvene etter transplantasjon ble tatt om morgenen før administrering av MMF-dosen (C_0 -prøve).

3.4.2 Immunsuppressiv protokoll

Immunsuppressiv behandling av nyretransplanterte følger gjeldende protokoller. Første dose steroider, 30 mg prednisolon peroralt, gis dagen før transplantasjon. Transplantasjonsdagen får pasienten totalt 580 mg metylprednisolon intravenøst. Videre gis prednisolon peroralt med nedtrapping 10 mg per dag fra 80 mg dag 1 til 20 mg fra dag 8 og utover. Ciklosporin gis første gang dagen før inngrepet, 10 mg/kg peroralt. Transplantasjonsdagen får pasienten 5 mg/kg 2 timer preoperativt og samme mengde postoperativt. Videre doseres ciklosporin etter farmakologisk monitorering av C_2 , blodkonsentrasjon 2 timer etter doseinntak. Det tilstrebes en blodkonsentrasjon mellom 1500 og 2000 ng/mL. Mykofenolat gis i faste doser av 1 g MMF to ganger daglig, første dose transplantasjonsdagen. Ved HLA-identitet gis 20 mg basiliximab før transplantasjonen og dag 4, i stedet for MPA (Personlig kommunikasjon; K. Midtvedt, Med. avd., Rikshospitalet).

3.4.3 *Prøvemateriale*

På hvert prøvetidspunkt ble det samlet blodprøver i tre 3 mL EDTA-rør, ett 4 mL EDTA-rør og ett PAXgene™-rør. PAXgene™-røret inneholder 6,9 mL RNA-stabiliseringsløsning og trekker 2,5 mL fullblod. Standard venepunksjonsprosedyre ble benyttet, og prøven i PAXgene™-røret ble tatt til slutt.

Det ene 3 mL EDTA-røret ble benyttet til isolering av retikulocytter for ekspresjonsanalyse. Til isolering av CD4⁺ celler for ekspresjonsanalyse ble det også benyttet 3 mL EDTA-rør. PAXgene™-røret ble brukt til ekspresjonsanalyse i fullblodceller. Det siste 3 mL EDTA-røret ble sentrifugert. Plasma ble brukt til konsentrasjonsmåling av MPA, mens cellepellet ble benyttet til måling av IMPDH-aktivitet i fullblodceller. 4 mL-røret ble brukt til isolering av CD4⁺ celler for aktivitetmåling av IMPDH.

I denne oppgaven er det fokusert på prøvene til ekspresjonsanalyse av retikulocytter og fullblodceller.

3.4.4 *Prøvebearbeidelse*

3.4.4.1 RETIKULOCYTTER

Cellulose ble veid inn på analysevekt. Mengden cellulose var 0,5 g mikrokrySTALLINSK cellulose og 0,5 g α -cellulose til hver sprøyte, pluss 0,5 g i overskudd av hver cellulosestype for hver batch. Eksempelvis ved innveiling til to sprøyter, ble total mengde av hver cellulosestype 1,5 g ($0,5 \times 2 + 0,5 = 1,5$). Cellulosen ble overført til en 100 mL erlenmeyerkolbe med vid hals. Den ble slemmet opp med 10 mL PBS per gram total cellulosemengde.

Stempelet ble fjernet fra en 20 mL steril engangssprøyte Luer-Lok™, og sprøyta ble plassert i et stativ over et oppsamlingskar. Et filterpapir med diameter 1,5 cm ble plassert i bunnen av sprøyta og fuktet med PBS. Omtrent 6 mL oppslemmet cellulose ble overført til sprøyta ved hjelp av en 3 mL pasteurpipette i plast. Overflødig væske fikk renne ut av sprøytespissen slik at cellulosen til slutt dannet en kolonne opp til

3 mL-streken i sprøyta. Dersom kolonnen ble for lav, ble det tilsatt litt ekstra av den oppslemmede cellulosen. Cellulosekolonnen var klar til bruk etter henstand i minst 15 minutter.

Til oppsamling av eluat ble det brukt 5 mL Vacutainer™-rør. Sprøyta med cellulosekolonnen ble plassert ovenfor røret, uten kork, i et spesialtilpasset stativ. Forsiktig ble 2 mL EDTA-blod satt på kolonnen. Prøven fikk trekke fullstendig ned i cellulosekolonnen. Deretter ble 2 mL PBS påsatt til eluering av prøven.

Eluatet fra filtreringen ble sentrifugert ved 3500 g (4500 rpm) i 5 minutter. Supernatanten ble sugd av og kastet. Det ble så tilsatt 800 µL Lysis/Binding Buffer (fra MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance) for å lysere cellene og stabilisere RNA. Prøven ble straks vortexet i 30 sekunder. Her var det viktig å ikke riste på røret først, for da ville det legge seg klumper på veggen i røret. Prøven ble frosset ned i 1,5 mL Sarstedt-rør ved -70 °C.

3.4.4.2 FULLBLØDCELLER

PAXgene™-rør ble etter prøvetaking inkubert i romtemperatur i 2-3 timer for å sikre fullstendig lysering av alle celler og stabilisering av RNA. Deretter ble røret frosset ved -70 °C (21).

3.4.5 Analyseprinsipp

Metoden for ekspresjonsanalysen var spesifikk kvantitativ sanntids revers transkripsjon-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) i to separate trinn; først cDNA-syntese ved revers transkripsjon, ut fra isolert total-RNA fra prøvene, og deretter spesifikk amplifikasjon ved sanntids PCR (21).

3.4.6 *Isolering av total-RNA*

Total-RNA ble isolert fra prøvene ved hjelp av instrumentet MagNA Pure LC (Magnetic Nucleic Acid Purification LightCycler®) i henhold til metoden beskrevet av Bremer (21).

Prøvene ble tint og overført til prøvebrett. Retikulocyt-prøvene ble godt blandet opp ved vortexing, før 720 µL ble overført til en brønn i prøvebrettet. PAXgene™-rørene ble vendt opp ned flere ganger til innholdet var homogent og 1 mL av dette ble sentrifugert. Supernatanten ble dekantert av og pelleten ble resuspendert i 750 µL Lysis/binding Buffer. Av dette ble 720 µL overført til en brønn i prøvebrettet.

Videre ble total-RNA isolert fra brønnene i prøvebrettet ved hjelp av MagNA Pure LC med MagNA Pure LC RNA High Performance Isolation Kit. Ferdig isolert total-RNA, 50 µL fra hver prøve, ble overført til 1,5 mL Sarstedt-rør og oppbevart ved -70 °C.

3.4.7 *Revers transkripsjon*

Total-RNA, til sammen 10 µL av RNA-eluatet fra hver prøve, ble revers transkribert til cDNA ved bruk av random primere i varmeblokk med oppvarmet lokk. Syntetisert cDNA ble frosset ved -20 °C (21).

3.4.8 *Sanntids PCR*

Ekspresjonen av *IMPDH I* og *IMPDH II* ble kvantifisert relativt i forhold til ekspresjonen av tre husholdningsgener. I tillegg til 5-aminolevulinat-syntase (*ALAS*) og glukose-6-fosfat-dehydrogenase (*G6PDH*), som ble valg ut i utviklingen av analysemetoden (21), ble også husholdningsgenet β_2 -mikroglobulin (*β_2M*) benyttet.

PCR-analyse for de fem genene *IMPDH I*, *IMPDH II*, *ALAS*, *β_2M* og *G6PDH* ble gjort hver for seg. Det ble laget en reaksjonsblanding av vann, MgCl₂, primere, prober og Fast Start DNA Master Hybridization Probes til hver analyse. Primere og prober til analyse av *IMPDH I* og *IMPDH II* var spesialdesignet, mens det for husholdningsgenene ble brukt ferdige kit fra leverandøren (31).

MagNA Pure LC-instrumentet ble brukt til automatisk pipettering av PCR-reaksjonsblanding og prøveløsninger over i LightCycler®-kapillærer. Til hvert glasskapillær ble det pipettert 15 μ L reaksjonsblanding og 5 μ L prøvemateriale. En cDNA kalibrator (21), samt vann og en standard for det genet som ble analysert, var med i hver PCR-kjøring.

LightCycler®-systemet fra Roche ble benyttet til sanntids PCR av cDNA. PCR-protokollen startet med et denaturerings- og aktiveringstrinn ved 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 45 PCR-sykler. Hver syklus bestod av et denatureringstrinn ved 95 °C i 10 sekunder, et annealingstrinn ved 58 °C i 10 sekunder og et elongeringstrinn ved 72 °C i 10 sekunder. Produktene ble analysert underveis i amplifiseringen (såkalt *sanntids PCR*) ved måling av fluorescens fra spesifikke prober bundet til PCR-produkter. Crossing point (Cp)-verdien ble definert ved det antall sykler hvor fluorescenskurvens annenderiverte har høyest verdi (stigningen øker mest). Denne Cp-verdien ble brukt videre i kvantifiseringen. Etter amplifiseringen ble det utført smeltekurveanalyse ved først et denaturerings- og inaktiveringstrinn på 98 °C i 5 minutter, temperaturreduksjon til 45 °C, og gradvis økning med 0,1 °C per sekund til 95 °C med kontinuerlig fluorescensmåling (21).

3.4.9 Databehandling; relativ kvantifisering av ekspresjonen

Relative Expression Software Tool (REST-384®) (32) ble brukt for å kvantifisere ekspresjonen av *IMPDH I* og *IMPDH II* relativt til de tre husholdningsgenene. Dette verktøyet er i stand til å beregne ekspresjonen av flere målgener relativt til ekspresjonen av en gruppe referansegener. Standardkurver for hvert av målgenene og husholdningsgenene ble konstruert ved å amplifisere seriefortynninger av cDNA og plote Cp-verdi mot logaritmen til cDNA-konsentrasjon (21). Disse standardkuvene danner grunnlag for verktøyets beregning av PCR-effektiviteten. Ut fra prøvens og kalibratorens Cp-verdier fra PCR-analysen for hvert gen, og PCR-effektiviteten, beregnet verktøyet prøvens relative ekspresjon. Relativ ekspresjon er her definert som ekspresjon av målgen relativt til ekspresjon av husholdningsgenene, normalisert til samme forhold i kalibratoren. Når ikke annet spesifikt er nevnt, er det denne utregning

av relativ ekspresjon som er benyttet. Dataene ble videre bearbeidet i Microsoft Excel 2002.

Det ble også beregnet ekspresjonsratio av målgenene i forhold til hvert referansegene separat. Til dette ble programmet LightCycler RelQuant (Relative Quantification Software, Roche, version 1.01) benyttet (33).

3.4.10 Utvelgelse av prøver til analyse

LightCycler®-karusellen har plass til 32 glasskapillærer. Kalibratoren opptok tre av plassene, mens vann og standard opptok hver sin plass. 27 plasser gjenstod da til pasientprøver. Siden tre paralleller ble analysert for hver prøve, var det bare plass til ni prøver i hver PCR-kjøring. Det var samlet inn inntil elleve prøver av hver prøvetype fra hver pasient. Ni av disse ble analysert for ekspresjon i første omgang. Alle prøvene fra starten av forløpet samt den siste prøven fra hver pasient ble analysert.

3.4.11 Godkjenning av studien

Studien ble etter søknad godkjent av *Regional komité for medisinsk forskningsetikk Sør-Norge* (REK Sør). Det ble opprettet forskningsbiobank, og studien ble meldt inn til *Norsk samfunnsvitenskaplige datatjeneste* (NSD).

4 RESULTATER

4.1 Metodeutvikling

4.1.1 Isolering med paramagnetiske kuler

Det viste seg å være vanskelig å bestemme utbyttet etter isolering med paramagnetiske kuler. Coulter partikkelteller egnet seg dårlig til dette formålet ettersom kulene fortsatt var koblet til cellene. Mikroskopering av fargede utstryk indikerte at retikulocytutbyttet var lavt. Antallet visuelt talte celler i forhold til kuler var langt lavere enn hva et teoretisk utbytte skulle tilsi. Inkubering i romtemperatur ga et høyere antall celler i utstryk enn kjølig inkubering. Forlenget inkuberingstid, det vil si mer enn 20 minutter, ga også et høyere antall celler. Man kom frem til at optimal kulemengde var 140 μL kulesuspensjon per mL fullblod. Dette tilsvarer 10-12 kuler per 1×10^3 røde blodlegemer, som anbefalt i metodeartikkelen til Brun *et al* (24). Resultater fra ekspresjonsanalysen viste at prøver fra retikulocytter isolert med dynalkuler direkte fra fullblod inneholdt en mindre mengde RNA enn forventet.

4.1.2 Filtrering på cellulosekolonne

Som anbefalt av Beutler *et al* i metodeartikkelen om leukocyt-filtrering (27), ble det brukt like mengder av de to cellulose typene. Volum PBS i forhold til cellulosemengde ble optimalisert til 10 mL PBS per gram av de to cellulose typene til sammen. Sterile engangssprøyter, 20 mL, med Luer-Lok™ hadde passe stor indre diameter til å gi tilstrekkelig filtreringskapasitet, og sentrert sprøytespiss var nødvendig for å kunne dekke åpningen med et filterpapir. Filterpapir med diameter 1,5 cm passet oppi sprøytene, og med en porestørrelse på 11 μm holdt filterpapiret igjen cellulosepartiklene samtidig som røde blodlegemer passerte gjennom. Rask sedimentering etter oppslemming av cellulose var et problem, og dette krevde en bestemt teknikk ved overføring til sprøytene.

Det var vanskelig å lage gode utstryk av eluat på grunn av lavviskøst medium, men mikroskopering ga likevel et inntrykk av totalt fravær av leukocytter. Celletellinger utført på Celldyn bekreftet at filtreringen fjerner leukocytene meget effektivt, se 4.1.4.

Et prøvevolum på 2 mL fullblod og eluering med 2 mL PBS i én porsjon viste seg å være optimalt for at filtreringen skulle gå raskt og samtidig gi nok materiale til ekspresjonsanalysen. Med disse volumene tok hele filtreringsprosedyren med sentrifugering og cellelysering omtrent 40 minutter. Ved større prøvevolum, større elueringsvolum eller flere elueringsporsjoner tok filtreringen lengre tid. I følge resultatene fra ekspresjonsanalysen inneholdt prøver etter filtrering nok mRNA for IMPDH til å kunne kvantifisere ekspresjonen av *IMPDH I* og *IMPDH II* relativt til husholdningsgener. Cp-verdiene lå i området 30-35 sykler for målgenene.

4.1.3 Kombinert filtrering og isolering med paramagnetiske kuler

Ved kombinerings av de to metodene ble eluat fra filtreringen tilsatt dynalkuler med antistoff mot CD71. Selve isoleringsmetoden tok omtrent 30 minutter, inkludert 20 minutters inkubering. Det vil si at man brukte til sammen over 1 time på filtrering og isolering. Ved håndtering av flere prøver samtidig tok det enda lengre tid.

Mikroskopering av utstryk viste at isolatene inneholdt enkelte retikulocytter, men også her var antallet retikulocytter i forhold til kuler langt lavere enn hva teoretisk mulig utbytte skulle tilsi. Resultatene fra ekspresjonsanalyser av filtrerte og kule-isolerte celleprøver viste at prøvene inneholdt mRNA, men i så liten mengde at PCR-analysen ikke ga noe resultat for alle genene, eller at Cp-verdiene ble svært høye (over 36 sykler for målgenene).

4.1.4 Validering

Det ble besluttet å bare benytte filtrering i prøveoppbeholdelsen. Filtreringsmetodens effektivitet og utbytte ble beregnet med utgangspunkt i celledetelling fra Celldyn 4000. Effektiviteten defineres her som den andelen av leukocytene i påsatt fullblodprøve som sitter igjen i cellulosekolonnen etter filtrering, det vil si den andelen som fjernes fra prøven. Relativt utbytte defineres som antall retikulocytter i eluat i forhold til antall retikulocytter i påsatt fullblodprøve.

Det innledende forsøket viste at egnet resultatvolum etter filtrering, sentrifugering og resuspending var 1 mL. Konsentrasjonen av erythrocytter ble da funnet å være tilnærmet lik normalverdi i fullblod. Påsatt volum fullblod på 2 mL og eluering med 2 mL PBS ga et eluat på 4 mL, som altså ble oppkonsentrert til 1 mL før celledelling.

Tabell 3: Variasjon i filtreringens utbytte og effektivitet som følge av ulike henstandstid, 0-90 minutter

| FORSØK I | Retikulocytter | | Retik/RBC ⁴ | Leukocytter | |
|--|----------------|-------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|
| Fullblod 2 mL HCT ¹ 39,1 % | 106E+6 | | 1,2 % | 17E+6 | |
| Henstandstid ² | Antall i eluat | Relativt utbytte ³ | I eluat | Antall i eluat | Andel fjernet ⁵ |
| 0 min | 39E+6 | 0,36 | 1,2 % | 0,33E+6 | 0,980 |
| 15 min | 43E+6 | 0,41 | 1,3 % | 0,28E+6 | 0,983 |
| 30 min | 34E+6 | 0,32 | 1,2 % | 0,042E+6 | 0,997 |
| 45 min | 39E+6 | 0,37 | 1,3 % | 0,017E+6 | 0,999 |
| 60 min | 37E+6 | 0,35 | 1,4 % | 0,019E+6 | 0,999 |
| 75 min | 42E+6 | 0,39 | 1,4 % | 0,027E+6 | 0,998 |
| 90 min | 34E+6 | 0,32 | 1,2 % | 0,012E+6 | 0,999 |

1) HCT: hematokritverdi i fullblodprøven før filtrering. 2) Henstandstid: tiden fra cellulosekolonnen var ferdig tillaget til fullblodprøven ble påsatt. 3) Relativt utbytte: Forholdet mellom antall retikulocytter i eluat fra filtreringen og antall retikulocytter i påsatt fullblodprøve. 4) Retik/RBC: Prosent retikulocytter av totale røde blodlegemer. 5) Andel fjernet: Effektivitet; forholdet mellom antall leukocytter i eluatet og antall leukocytter i påsatt fullblodprøve.

Resultatene fra testing av variasjon i filtreringens effektivitet og utbytte som følge av ulike henstandstid, tiden fra cellulosekolonnen var ferdig laget til fullblodprøven ble påsatt, er oppgitt i Tabell 3 og Tabell 4. Forsøk I og II er gjort på ulike dager og følgelig med ulike fullblodprøver, men det er brukt identiske fullblodprøver i alle parallellene innenfor hvert av forsøkene. Resultatene fra forsøk I viser at effektiviteten var lavest ved filtrering straks etter tillaging av cellulosekolonnen. Effektiviteten var litt høyere ved filtrering på en kolonne som hadde stått i 15 minutter etter tillaging, og ytterligere litt høyere ved henstand i 30 minutter. Henstand i mer enn 30 minutter ga ikke ytterligere økt effektivitet.

Tabell 4: Variasjon i filtreringens utbytte og effektivitet som følge av ulik henstandstid, 0-60 minutter

| FORSØK II | Retikulytter | | Retik/RBC ⁴ | Leukocyter | |
|--|----------------|-------------------------------|------------------------|----------------|----------------------------|
| Fullblod 2 mL HCT ¹ 38 % | 104E+6 | | 1,2 % | 12E+6 | |
| Henstandstid ² | Antall i eluat | Relativt utbytte ³ | I eluat | Antall i eluat | Andel fjernet ⁵ |
| 0 min | 41E+6 | 0,39 | 1,2 % | 0,081E+6 | 0,993 |
| 15 min | 36E+6 | 0,35 | 1,2 % | 0,039E+6 | 0,997 |
| 30 min | 56E+6 | 0,53 | 1,7 % | 0,094E+6 | 0,992 |
| 45 min | 40E+6 | 0,38 | 1,1 % | 0,11E+6 | 0,991 |
| 60 min ⁶ | - | - | - | 0,086E+6 | 0,993 |

1-5) Se Tabell 3 for forklaringer. 6) Celldyn oppga ikke noe celletall for retikulytter i dette eluatet.

Resultatene fra det andre forsøket (Tabell 4) viser ingen sammenheng mellom filterkolonnens henstandstid og effektiviteten. I begge forsøkene varierte utbyttet av retikulytter noe, men variasjonen var uavhengig av henstandstiden. Både Tabell 3 og Tabell 4 viser at retikulytt-prosenten blant de røde blodcellene var tilnærmet lik i eluatene som i tilhørende fullblodprøver.

Tabell 5: Sammendrag av resultater fra forsøk I og II; variasjon som følge av ulik henstandstid

| | Relativt utbytte retikulytter (i forhold til fullblodprøven) | | | Filtreringens effektivitet, andel leukocyter fjernet | | | Antall retikulytter per leukocyt i eluat |
|---------------------------------|---|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|---|
| | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) |
| Forsøk I n = 7 | 0,36 (0,32-0,41) | 0,030 | 8,5 % | 0,998 (0,980-0,999) | 0,0078 | 0,78 % | 1537 (116-2817) |
| Forsøk II n = 5 ¹ | 0,39 (0,35-0,53) | 0,071 | 17 % | 0,993 (0,991-0,997) | 0,0023 | 0,23 % | 546 (358-931) |

1) I den siste parallellen (henstandstid 60 minutter) oppga ikke Celldyn noe celletall for retikulytter, se Tabell 4. Utbyttet er derfor beregnet ut fra de fire første "parallelle" (n = 4), mens effektiviteten er beregnet ut fra alle fem "parallelle" (n = 5). 2) SD = standardavvik. 3) CV = SD/gjennomsnitt = variasjonskoeffisient.

Tabell 5 viser et sammendrag av resultatene fra de to forsøkene med ulike henstandstider. I det første forsøket hadde effektiviteten en medianverdi på 0,998 med variasjonskoeffisienten (CV) 0,78 %. I det andre forsøket lå median effektivitet på 0,993. Her var CV 0,23 %. Median utbytte av retikulocytter var 0,36 i forsøk I og 0,39 i forsøk II, med CV henholdsvis på 8,5 % og 17 %. Det laveste antall retikulocytter per leukocyt i eluat var 116, mens det høyeste var på 2817. Til sammenligning er det i blodet hos en normalperson omtrent ti ganger så mange reticulocytter som leukocytter. Dette viser at retikulocytene etter isoleringen er i stort overtall i forhold til leukocytene, men forholdet varierer.

Et sammendrag av resultatene fra testing av variasjon i filtreringens utbytte og effektivitet mellom ulike operatører er vist i Tabell 6. Median utbytte var 0,52 i prøvene bearbeidet av operatør A, mens den var 0,48 for operatør B. Sammenlagt for begge operatørene var CV for utbyttet 8,9 %. Effektiviteten var noe lavere for operatør A med median 0,982 enn for operatør B med median 0,995, og variasjonen var størst i resultatene fra operatør A. Sammenlagt CV for begge operatørene var 1,4 %. Antall retikulocytter per leukocyt i eluat var mer enn 134 i alle parallellene, og høyeste verdi var 2130.

Tabell 6: Variasjon mellom ulike operatører

| | Relativt utbytte retikulocytter (i forhold til fullblodprøven) | | | Filtreringens effektivitet, andel leukocytter fjernet | | | Antall retikulocytter per leukocyt i eluat |
|----------------------------------|---|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|---|
| | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) |
| Operatør A n = 5 ¹ | 0,52 (0,45-0,57) | 0,042 | 8,1 % | 0,982 (0,955-0,992) | 0,013 | 1,3 % | 314 (134-582) |
| Operatør B n = 5 ¹ | 0,48 (0,43-0,56) | 0,044 | 9,0 % | 0,995 (0,988-0,997) | 0,0033 | 0,33 % | 938 (505-2130) |
| Totalt n = 10 ¹ | 0,50 (0,43-0,57) | 0,044 | 8,9 % | 0,990 (0,955-0,997) | 0,014 | 1,4 % | 543 (134-2130) |

- 1) n = antall paralleller, hver operatør gjorde 5 parallelle filtreringer med identiske fullblodprøver.
2) SD = standarddeviasjon. 3) CV = variasjonskoeffisient.

Resultatene fra testing av variasjon mellom ulike prøver er summert opp i Tabell 7. Median effektivitet var 0,996 med CV på 0,16 %. Det var altså liten variasjon i metodens effektivitet ved filtrering av ulike prøver. Hematokrit-verdien hadde liten innvirkning på effektiviteten. Variasjon i utbyttet (CV) var 30 %. Median var 0,29, mens laveste og høyeste utbytte var henholdsvis 0,17 og 0,50.

Tabell 7: Variasjon mellom ulike prøver; 3 pasientprøver og 3 prøver fra friske frivillige ble filtrert av samme operatør, to paralleller per prøve.

| | Relativt utbytte retikulocytter (i forhold til fullblodprøven) | | | Filtreringens effektivitet, andel leukocytter fjernet | | | Antall retikulocytter per leukocyt i eluat |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|---|
| | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) | SD ² | CV ³ | Median (min-maks) |
| Totalt n = 12 ¹ | 0,29 (0,17-0,50) | 0,092 | 30 % | 0,996 (0,992-0,998) | 0,0016 | 0,16 % | 772 (282-1196) |

1) 6 ulike fullblodprøver, 2 parallele filtreringer fra hver prøve, n = totalt antall filtreringer. Hematokrit-verdiene i fullblodprøvene varierte fra 32 % til 44 %. 2) SD = standardavvik.

3) CV = variasjonskoeffisient.

Filtrering ga totalt et gjennomsnittlig utbytte retikulocytter på 39 % og en effektivitet på 99,2 %. I fullblod var det gjennomsnittlig 10 retikulocytter per leukocyt, mens det etter filtrering var 886 i gjennomsnitt. Filtringen fjernet i tillegg gjennomsnittlig 89 % av trombocytene i fra blodprøvene. Disse tallene er beregnet på grunnlag av celledtelling etter totalt 33 filtreringer.

4.1.5 Endelig isoleringsprosedyre

Den endelige prosedyren for isolering av retikulocytter er beskrevet under punkt 3.4.4.1.

I det videre arbeidet ble denne metoden benyttet.

4.2 Pasientstudie

Dette prosjektet inkluderte totalt 13 nyretransplanterte pasienter, hvorav fire kvinner og ni menn (Tabell 8). Pasientene ble nummerert fra 001 til 014, men pasient 005 utgikk fra prosjektet. Alderen varierte fra 25 til 65 år, med en median på 44 år. Alle pasientene i studien fikk organ fra levende giver. Ved åtte av transplantasjonene var donor i slekt med pasienten, mens det var fem transplantasjoner av nyre fra ubeslektet giver. Som det framgår av tabellen, fikk 10 av pasientene kortikosteroider, ciklosporin og MPA som immunsuppressiv behandling. Hos én pasient (retransplantasjon) ble takrolimus gitt i stedet for ciklosporin, i tillegg til MPA og kortikosteroider. Det var to pasienter som ikke fikk MPA. Disse ble behandlet med basiliximab, takrolimus og kortikosteroider. Donor var i begge tilfellene ubeslektet med resipienten, og begge var retransplantasjoner. Immunsuppressivene ble dosert etter gjeldende protokoll, se 3.4.2.

Tabell 8: Pasientdata

| Pasientdata n = antall pasienter | MPA ⁵ n = 11 | Ikke MPA ⁶ n = 2 |
|---|----------------------------|--------------------------------|
| Alder, år ¹ | 46 (25-65) | 34 (34-34) |
| Kjønn K / M ² | 2 / 9 | 2 / 0 |
| Donor ³ | 8 LR / 3 LUR | 0 LR / 2 LUR |
| Re-transplantasjon ⁴ | 1 | 2 |
| Immunsuppressiv behandling: | | |
| MPA, ciklosporin, kortikosteroider | 10 | 0 |
| MPA, takrolimus, kortikosteroider | 1 | 0 |
| Basiliximab, takrolimus, kortikosteroider | 0 | 2 |

1) Alder: Median (minimum - maksimum). 2) Kjønn: K = antall kvinner, M = antall menn. 3) Donor: LR = levende, beslektet med resipient (living related), LUR = levende, ubeslektet med resipient (living unrelated). 4) Re-transplantasjon: antall pasienter som tidligere hadde gjennomgått nyretransplantasjon. 5) MPA: Pasienter som fikk MPA-behandling. 6) Ikke MPA: Pasienter som ikke fikk MPA-behandling.

4.2.1 Ekspresjonsendringer hos nyretransplanterte under MPA-behandling

I det følgende er resultater fra flere prøvetidspunkter gruppert slik at ekspresjonsendringene for hver pasient fremkommer som en kurve med fire punkter. De tre første punktene representerer medianen både med hensyn på ekspresjonsresultat og prøvetakingstidspunkt. Det første punktet representerer prøvene tatt før transplantasjon og det andre punktet de fire første dagene etter transplantasjon. Prøvene fra dag fem til og med nest siste prøve representeres av tredje punkt på kurven, og det fjerde punktet viser ekspresjonen ved siste prøvetidspunkt. Figur 8 og Figur 9 summerer opp resultatene i form av mediankurver slik at det er lettere å sammenligne endringene i retikulocytter med endringene i fullblodceller for hvert av de to målgenene. En fullstendig oversikt over Cp-verdier og relativ ekspresjon finnes i Appendiks.

4.2.1.1 *IMPDH I*

Ekspresjonen av *IMPDH I* økte i starten av forløpet. Økningen fant sted i retikulocytter hos 10 av 11 pasienter (Figur 4) og i fullblodceller fra samtlige pasienter (Figur 5). Den relative ekspresjonsøkningen var omtrent like stor i retikulocytter og fullblod (Figur 8). Etter den initiale stigningen falt ekspresjonen noe i fullblod. I retikulocytterne holdt ekspresjonen seg noenlunde stabil eller økte noe mot slutten av prøveinnsamlingsperioden. I den undersøkte populasjonen var det altså en generell tendens til at ekspresjonen av *IMPDH I* økte omkring transplantasjonstidspunktet, og at den videre holdt seg på et forhøyet nivå (Figur 8).

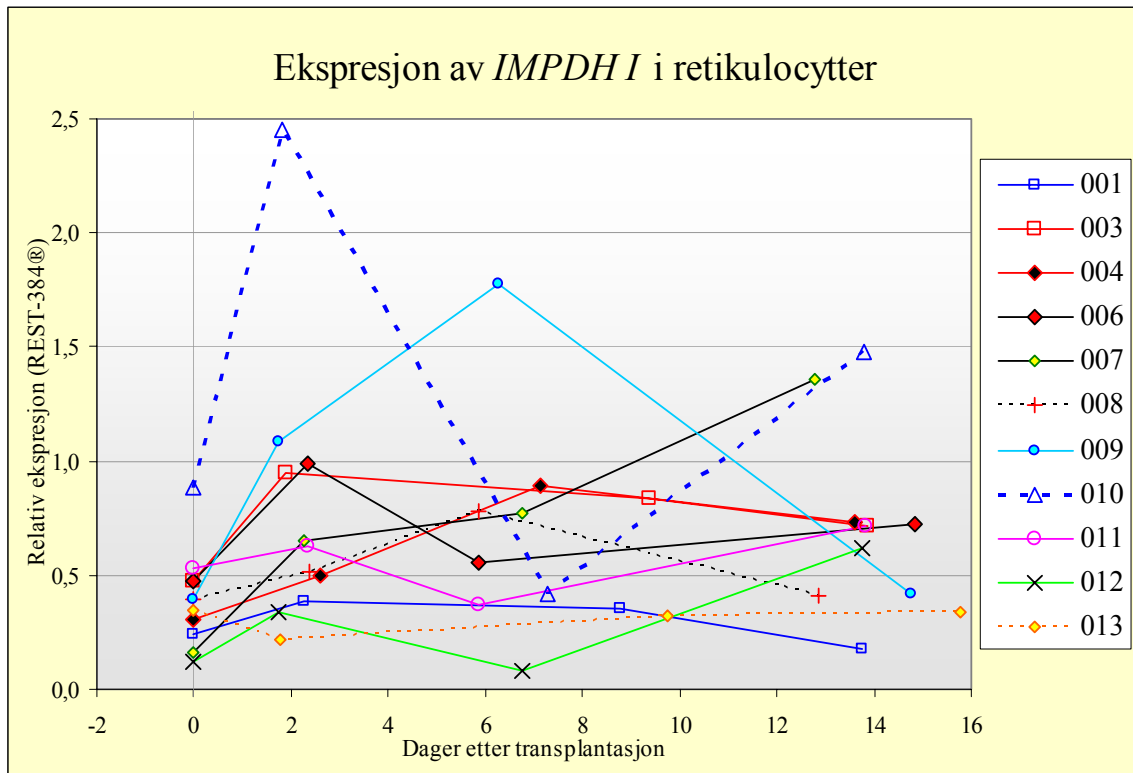
4.2.1.2 *IMPDH II*

Ekspresjonen av *IMPDH II* endret seg også i løpet av observasjonsperioden, men på en annen måte enn *IMPDH I*. I starten var det en reduksjon av ekspresjonen i retikulocytter hos alle pasientene (Figur 6). Det samme skjedde i fullblodceller (Figur 7), bortsett fra hos én pasient. Også for *IMPDH II* var de relative endringene like store i retikulocyttoprøver og fullblod. Videre i forløpet økte ekspresjonen igjen både i retikulocytter og i fullblodceller (Figur 9). I fullblodceller var imidlertid denne økningen svak, og kurvene flatet ut mot slutten på et nivå lavere enn utgangspunktet. Økningen var kraftigere i retikulocytter, og i disse cellene fortsatte økningen ut hele perioden, selv om den ble

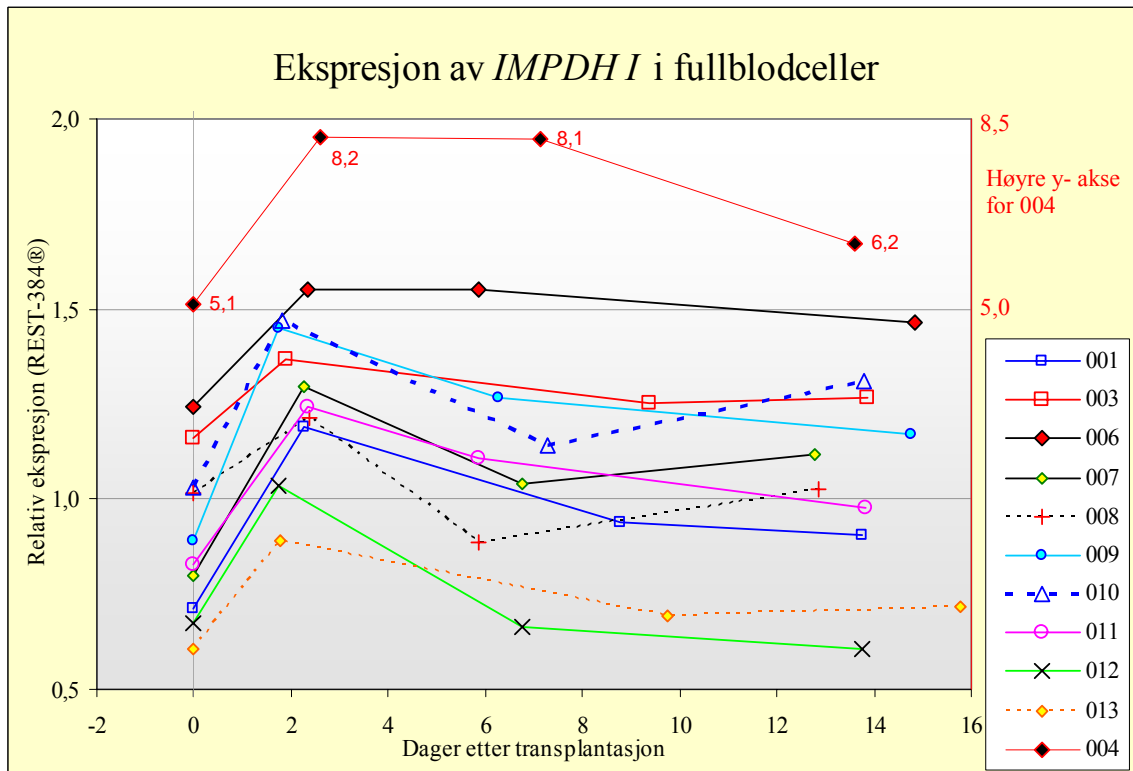
svakere mot slutten. Den generelle tendensen i undersøkt populasjon var altså reduksjon i ekspresjon omkring transplantasjonstidspunktet, og deretter økning utover i forløpet. I retikulocytter var ekspresjonen høyere ved slutten av observasjonsperioden enn før transplantasjon. Ekspresjonen i fullblodceller nådde imidlertid ikke opp igjen til samme nivå som før transplantasjon.

4.2.2 Ekspresjonsendringer hos nyretransplanterte som ikke fikk MPA-behandling

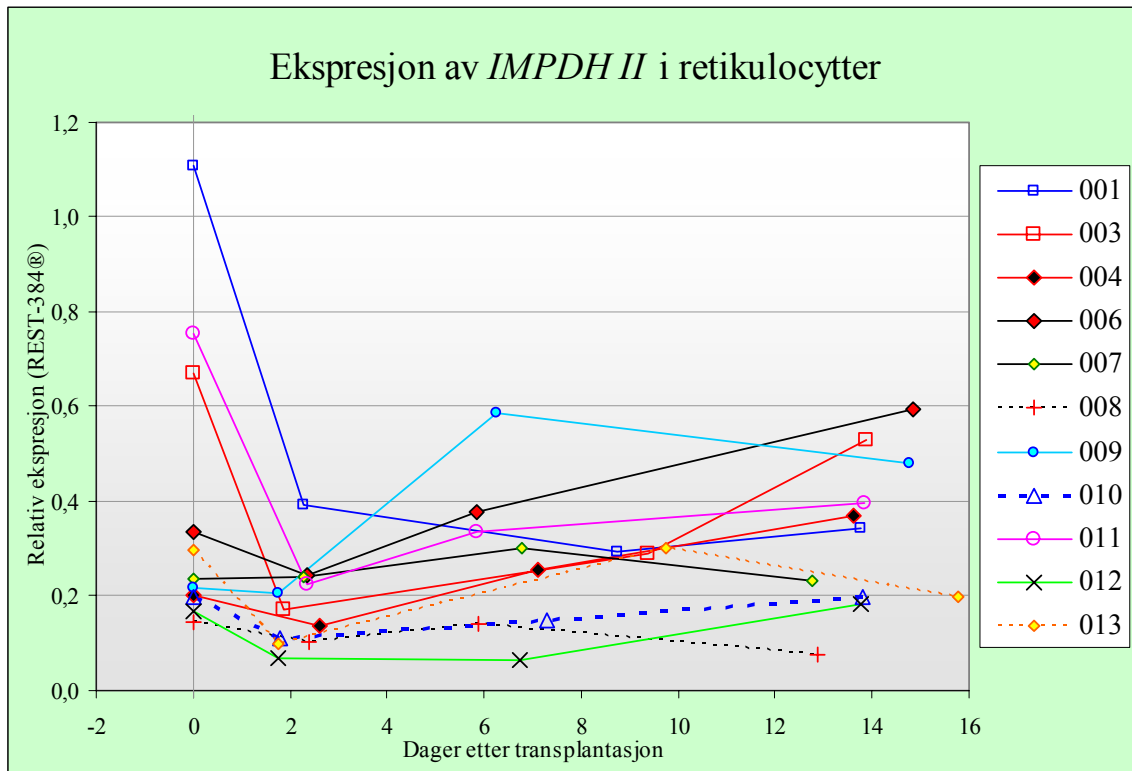
To av pasientene i studien fikk ikke MPA som en del av den immunsuppressive behandlingen. Ekspresjonen av *IMPDH I* i både fullblod og retikulocytter økte i starten hos begge pasientene (Figur 10). Deretter avtok ekspresjonen i fullblod og endte på omtrent samme nivå som utgangsnivået. I retikulocytterne var ekspresjonen mer stabil etter den initiale oppreguleringen. Ekspresjonsendringene i retikulocytter og fullblod var tilnærmet like for den enkelte. Når det gjelder *IMPDH II* endret ekspresjonen seg ulikt hos de to pasientene (Figur 11). Hos pasient 002 falt ekspresjonen i begge prøvematerialene. Pasient 014 hadde økende ekspresjon i retikulocytter til å begynne med. Deretter holdt ekspresjonen seg tilsynelatende stabil noen dager før den igjen steg. I fullblodceller hos samme pasient var ekspresjonen tilnærmet uendret i begynnelsen av perioden, med en lett økt ekspresjon mot slutten. Hovedinntrykket var at ekspresjonen hos pasient 002 var fallende mens ekspresjonen økte hos pasient 014. Endringene var større for retikulocytter enn i fullblod.



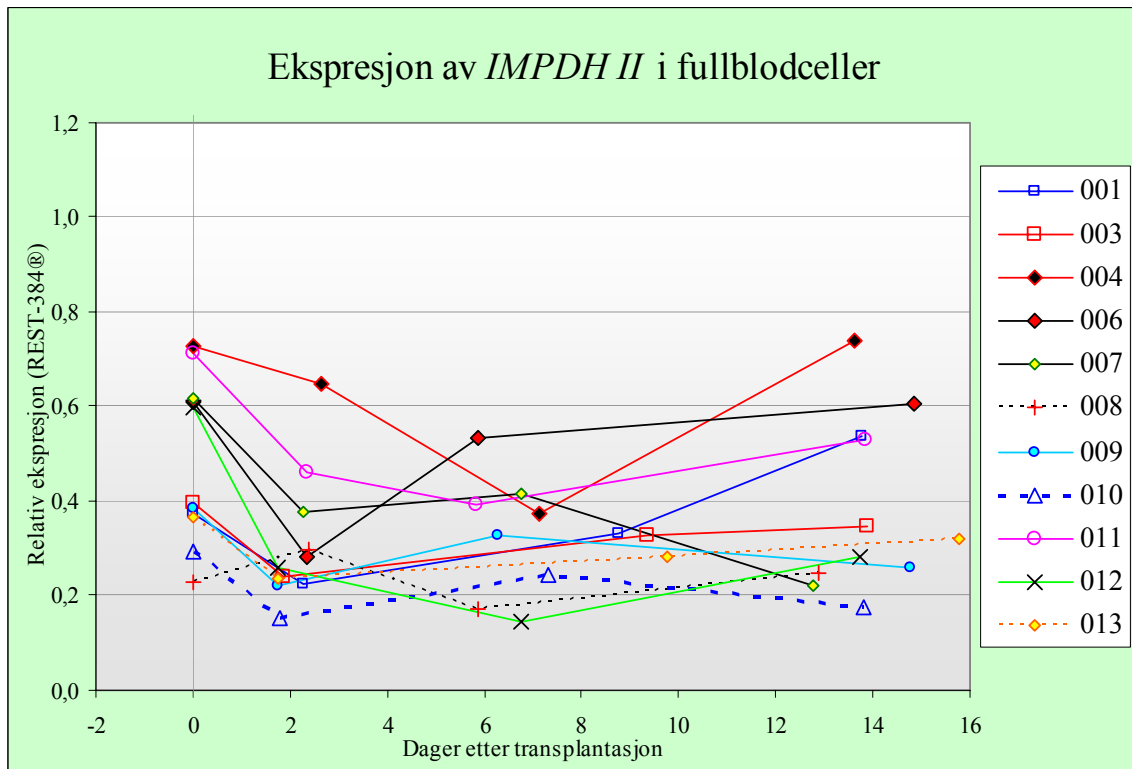
Figur 4: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH1* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i retikulocytter hos de 11 nyretransplanterte pasienter som fikk MPA. Hver kurve representerer én pasient.



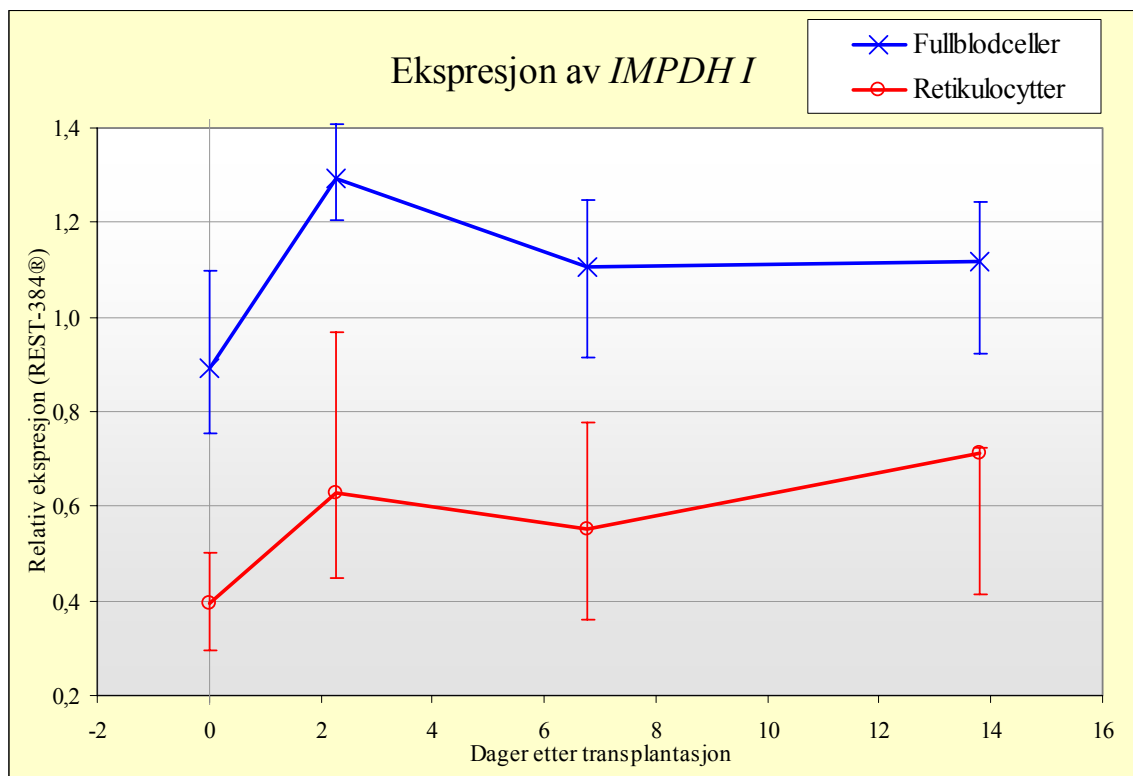
Figur 5: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH1* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i fullblodceller hos de 11 nyretransplanterte pasienter som fikk MPA. Hver kurve representerer én pasient.



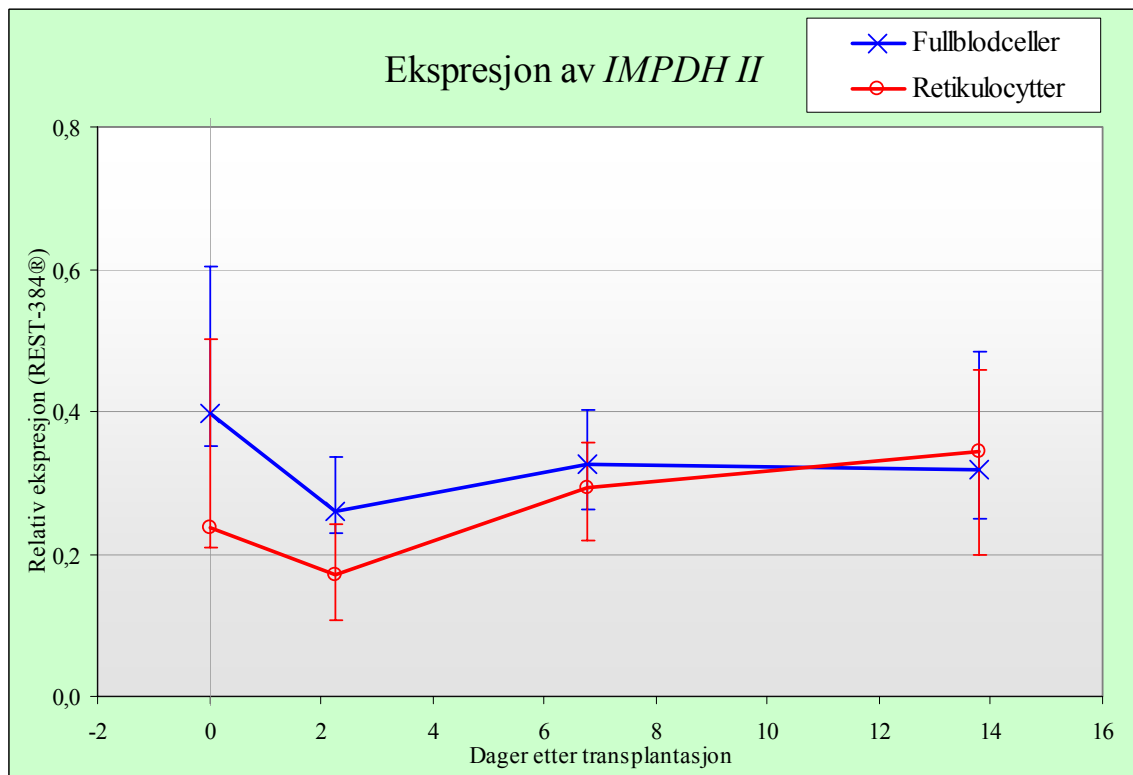
Figur 6: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH II* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i retikulocytter hos de 11 nyretransplanterte pasienter som fikk MPA. Hver kurve representerer én pasient.



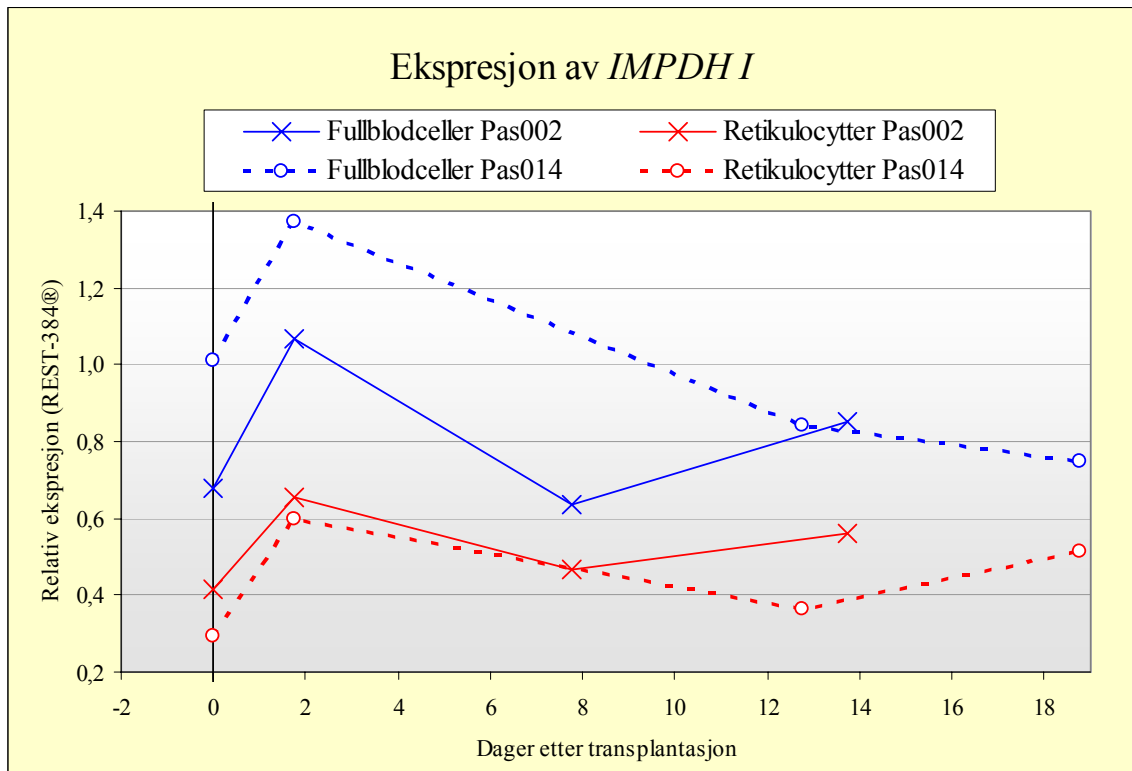
Figur 7: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH II* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i fullblodceller hos de 11 nyretransplanterte pasienter som fikk MPA. Hver kurve representerer én pasient.



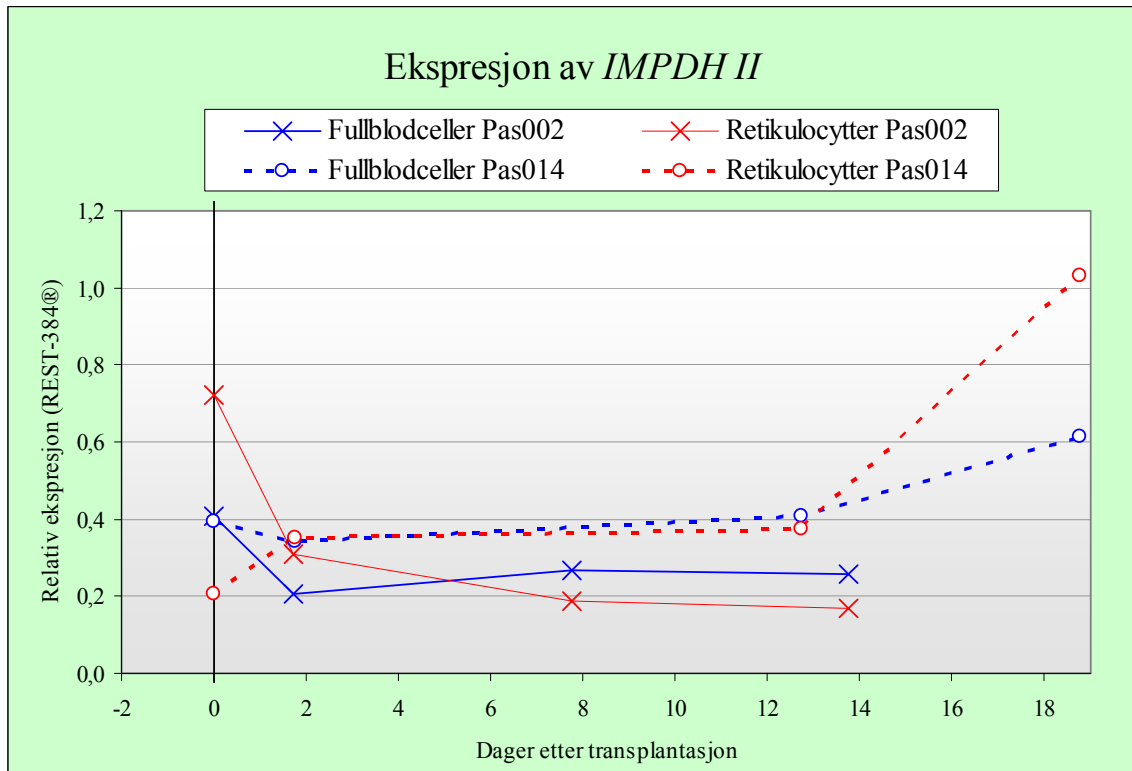
Figur 8: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH I* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, hos pasienter som fikk MPA, generell tendens i fullblodceller og i retikulocytter; median og range (1.kvartil-3.kvartil), n = 11.



Figur 9: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH II* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, hos pasienter som fikk MPA, generell tendens i fullblodceller og i retikulocytter; median og range (1.kvartil-3.kvartil), n = 11.



Figur 10: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH I* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i retikulocytter og fullblodceller hos de to pasienter som ikke fikk MPA.



Figur 11: Relative endringer i ekspresjon av *IMPDH II* relatert til husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase, β_2 -mikroglobulin og glukose-6-fosfat-dehydrogenase, i retikulocytter og fullblodceller hos de to pasienter som ikke fikk MPA.

4.2.3 Ekspresjonsendringer under rejeksjonsbehandling

Pasient 007, 009 og 011 fikk rejeksjonsbehandling med høye doser metylprednisolon i løpet av observasjonsperioden, henholdsvis fra dag 11, 10 og 10 etter transplantasjon. Ekspresjonen av *IMPDH II* i fullblod avtok under rejeksjonsbehandlingen hos alle disse tre pasientene (ikke alle enkeltpunkter er vist i diagrammene, men de er angitt i Appendiks). Tilsvarende endringer skjedde ikke i retikulocytene. Det var ingen felles tendenser til endringer i ekspresjon av *IMPDH I* hos de tre pasientene under rejeksjonsbehandling.

4.2.4 Ekspresjon i relasjon til IMPDH-aktivitet

Det forelå resultater for aktivitetsmålinger av enzymet IMPDH i fullblodceller fra pasient 001. Aktivitetsmålingene ble utført etter en tidligere publisert metode (20,34), og skiller ikke mellom de to isoformene av enzymet. Aktivitetskurven (ikke vist) ser i noen grad ut til å følge kurven for ekspresjon av *IMPDH II* i både fullblod og retikulocytter.

4.2.5 Kvantitativt innhold av genspesifikt mRNA i retikulocytter i forhold til fullblodceller

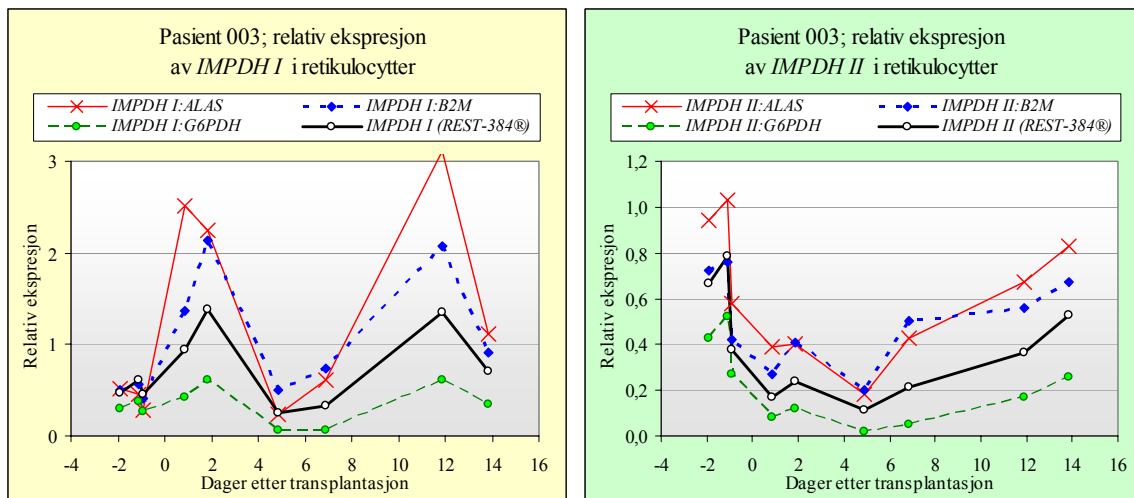
Hvis man går ut ifra et utbytte på 39 % i filtreringen (se punkt 4.1.4), tilsvarer retikulocyt-mengden i eluatet det antall retikulocytter som finnes i 0,8 mL fullblod (2 mL x 39 %). Videre brukes 720 µL av cellelysatet, som i utgangspunktet har et volum på omtrent 0,9 mL (Lysis/Binding Buffer + volum av cellepellet), til RNA-isolering. Prøvematerialet til RNA-isolering inneholder dermed en mengde retikulocytter tilsvarende 0,6 ml fullblod. Til analyse av fullblodprøver benyttes 1 mL av innholdet i PAXgene™-rørene (2,5 mL fullblod + 6,9 mL stabiliseringsløsning), slik at prøvematerialet til RNA-isolering tilsvarer 0,27 mL fullblod.

Dersom alt mRNA, spesifikt for de genene som undersøkes, i fullblod fantes i retikulocytter, kunne man forvente at Cp for retikulocyt-prøvene lå omtrent 1,2 sykler lavere enn Cp for fullblodprøvene ($2^n = 0,6 \text{ mL}/0,27 \text{ mL} \rightarrow n = 1,2$). Resultatene viser at gjennomsnittlig Cp for de ulike genene i retikulocyt-prøver er 2,4 til 4,3 sykler

høyere enn C_p for fullblodprøver (se Appendiks). Det vil si en forskjell på 3,6 til 5,5 syklers i forhold til om alt spesifikt mRNA i fullblod befant seg i retikulocytter. Dette er forenelig med at retikulocytter bidrar med anslagsvis 2 % ($1/2^{5,5} = 1/45 = 2\%$) til 8 % ($1/2^{3,6} = 1/12 = 8\%$) av spesifikk mRNA-mengde totalt i fullblod.

4.2.6 Relativ kvantifisering ved hjelp av REST-384® i forhold til relativ kvantifisering ved hjelp av LightCycler RelQuant 1.01

Normalisert ratio mellom målgenene og hvert enkelt av de tre husholdningsgenene (*ALAS*, *$\beta 2M$* og *G6PDH*) endres relativt likt (Figur 12). Formen på kurvene er tilnærmet lik, selv om utslagene er av forskjellig størrelse. Relativ ekspresjon beregnet ved hjelp av REST-384®, hvor alle husholdningsgenene inngår i beregningen, gir de samme utslagene i ekspresjonsendring som kvantifisering separat mot hvert enkelt husholdningsgen.



Figur 12: Eksempel på relativ ekspresjon av *IMPDH I* (til venstre) og *IMPDH II* (til høyre) beregnet i LightCycler RelQuant 1.01 som normalisert ratio separat til hvert av husholdningsgenene 5-aminolevulinat-syntase (*ALAS*), β_2 -mikroglobulin (*$\beta 2M$*) og glukose-6-fosfat-dehydrogenase (*G6PDH*), sammenlignet med relativ ekspresjon beregnet i REST-384®.

5 DISKUSJON

5.1 Metodeutvikling

Målet med metoddelen i denne oppgaven var å komme frem til en rask og skånsom metode for isolering av retikulocytter fra fullblod. Det var spesielt viktig at isolerte celler måtte være egnet for ekspresjonsanalyse med utgangspunkt i cellenes mRNA.

Intracellulært RNA bør stabiliseres raskest mulig etter prøvetaking. Uten stabilisering utsettes RNA for degradering av både spesifikke og uspesifikke endogene nukleaser. Studier har vist at mRNA-konsentrasjonen i fullblodprøver tatt i EDTA-rør endres ved lagring (30). I retikulocytter, som ikke utøver transkripsjon, vil aldri mRNA-konsentrasjonen kunne øke *ex vivo* som følge av induert ekspresjon, men sannsynligheten for at konsentrasjonen reduseres er stor. For at analysen skal gi et mest mulig riktig bilde av ekspresjonen (mRNA-innholdet) på prøvetakingstidspunktet, er det viktig å begrense degradering av intracellulært RNA fra prøvetaking til cellene er ferdig isolert. Cellene må derfor behandles mest mulig skånsomt, og isoleringen må gjennomføres i løpet av kort tid.

Celletettheten gjør at fullblod er forholdsvis viskøst sammenlignet med PBS. Derfor tar det lang tid for en fullblodprøve å passere gjennom en cellulosekolonne. For at filtreringen skulle kunne gjennomføres på kortest mulig tid, ble metoden optimalisert med hensyn på kolonnehøyde, kolonnediameter, prøvevolum, elueringsvolum og antall elueringsporsjoner. Vi endte opp med en filtrering som alene tar omtrent 30 minutter. Dertil kommer sentrifugering som tar 5 minutter, før cellene lyses med samtidig stabilisering av RNA. Dette antas å være akseptabel tid i forhold til å begrense degradering av RNA. Til sammenligning tar det omtrent 25 minutter å isolere CD4+ celler til samme type analyse (21).

Filtreringsmetoden gir et akseptabelt utbytte på omkring 39 %. Det laveste observerte utbyttet i valideringen var 17 %, og det høyeste var på 57 %. Forskjeller mellom ulike prøver ser ut til å være avgjørende for variasjoner i utbyttet, men man fant ingen direkte relasjon mellom utbytte og fullblodprøvens hematokrit-verdi. Utbyttet varierer relativt

lite mellom ulike operatører (Tabell 6) og det er usikkert om de påviste forskjellene skyldes operatørvariabler eller kun tilfeldig variasjon.

Filtreringens effektivitet i å fjerne leukocytter er svært høy, med et gjennomsnitt for alle filtreringene i valideringen på 99,2 % (CV = 0,9 %). Effektiviteten varierer lite, selv ved filtrering av prøver fra ulike personer. Størst variasjon i effektivitet ble observert i valideringen mellom ulike operatører. Det betyr at operatørens teknikk i tillaging av filter eller selve filtreringsteknikken kan ha betydning for effektiviteten. Trolig er det en sammenheng mellom hvor tettpakket cellulosepartiklene sitter i kolonnen og filtreringens effektivitet, noe som stemmer med mekanismen for cellulosekolonnens evne til å fange opp leukocytter (28). For å korrigere for eventuelle forskjeller i effektivitet mellom operatører, kunne det være en fordel om én person tok seg av tillaging av cellulosekolonner og filtrering av prøvene gjennom hele studien, men forskjellene er så små at flere operatører kan godtas. I studien var det totalt fem ulike operatører som tok seg av leukocytffiltreringen. Dette var nødvendig for å kunne inkludere tilstrekkelig mange pasienter og håndtere alle prøvene.

Det er tidligere vist at filtreringen er uselektiv med hensyn på aldersdistribusjon av røde blodlegemer (27). Ifølge dette vil retikulocytter, også de yngste, følge med væskestrømmen ut av kolonnen i samme grad som modne erytrocytter. Resultater fra valideringen viser at prosenten retikulocytter av totale røde blodlegemer er den samme i eluat fra filtreringen som i tilhørende fullblodprøve.

Isolering av retikulocytter med dynalkuler etter filtrering gjennom cellulose gir et rent isolat av retikulocytter (24). Hele prosedyren tar imidlertid lang tid å gjennomføre. Selv med kortest mulig inkubasjonstid på 20 minutter, var total tid for prøveoppbeholdelsen i overkant av 1 time. På denne tiden kan mye skje med RNA-innholdet i cellene. I tillegg til tiden for selve prøvebearbeidelsen må tiden fra prøvetaking til prøvene ankommer laboratoriet tas med i betraktning, noe som gjelder uansett isoleringsmetode. I pasientstudien ble logistikken nøye fulgt opp slik at tiden fra prøvetaking til igangsetting av prøvebearbeidelse typisk var under en halv time, og aldri mer enn 1 time.

Det viste seg at isolering med kuler ikke ga opphav til ekspresjonsresultater for alle genene. Man vet imidlertid ikke sikkert hva dette skyldes, men det er nærliggende å tro at det kan ha med lavt retikulocyt-utbytte å gjøre, særlig på bakgrunn av visuelt inntrykk av celleutbyttet ved mikroskopering. Det er vist i en studie at retikulocytter med relativt høy tetthet av CD71-markøren på celleoverflaten representerer omtrent en tredjedel av alle retikulocytter med et visst RNA-innhold (35). Dette betyr at under modningsprosessen, som foregår gradvis i løpet av omtrent et døgn, mister retikulocytene CD71-markører før de mister RNA. Ved isolering med kuler dekket med antistoffer mot CD71 isoleres altså kun de yngste retikulocytene, noe som kan være en forklaring på et lavt utbytte. Det kan også tenkes at sammenkoblingen mellom kuler og celler er så svak at en stor del av cellene faller av under vasketrinnene i isoleringen slik at celleutbyttet blir lite. Dersom man ikke hadde hatt kontroll på logistikken med prøvetaking kunne tiden fra prøvetaking til stabilisering av RNA hatt betydning for degradering av intracellulært RNA. Man kunne også tenkt seg at RNA-bidraget fra de leukocytene som er igjen i eluatet etter filtrering utgjorde en så stor andel av prøvens totale mengde RNA at dette gir et vesentlig bidrag til analyseresultatene fra prøver som bare er filtrert. Med tanke på filtreringens høye effektivitet har imidlertid leukocyttenes RNA-bidrag trolig liten betydning. Det kan heller ikke utelukkes at matriks-effekter av reagenser fra celleisoleringen påvirker isoleringen av RNA.

Siden filtreringen viste seg å gi gode resultater særlig i effektivitet, men også i utbytte, ble det vurdert om det kunne være tilstrekkelig å bare filtrere prøvene. Celleinnholdet i eluat fra filtreringen består av røde blodlegemer inkludert retikulocytter, noen trombocytter og noen ytterst få leukocytter. Blant de røde blodlegemene er retikulocytene de eneste cellene som inneholder RNA. I denne sammenhengen er det sannsynligvis uten betydning om en del modne erytrocytter følger med i celleisolatet, så lenge volumet av cellematerialet ikke blir for stort i forhold til antall målceller og RNA-innhold. Det ble derfor i all hovedsak fokusert på å fjerne leukocytter ettersom det er disse kjerneholdige cellene som kan bidra vesentlig til påvirkning av analyseresultatet. Eliminering av leukocytter oppnås ved filtrering gjennom cellulose.

Unge trombocytter kan, i likhet med retikulocytter, inneholde noe preformert mRNA (36,37). Trombocytter har heller ikke kjerne, så den lille mengden mRNA som eventuelt finnes er dannet i kjerneholdige forstadier til trombocytter. Det er tidligere publisert at filtrering gjennom cellulose fjerner omkring 80 % av trombocytterne fra fullblod (27). Valideringsresultatene viser at filtreringsmetoden utviklet i dette prosjektet fjerner en enda høyere prosent av trombocytterne. Dermed er risikoen for trombocyttenes påvirkning av analyseresultatene trolig så liten at man kan se bort ifra den.

Med tanke på å begrense tiden fra prøvetaking til cellene er ferdig isolert, ble isolering med dynalkuler vurdert som mindre formålstjenlig – selv om det kan bidra til noe større renhet i retikulocytfraksjonen. Den endelige metoden er en negativ isoleringsmetode fordi uønskede celler fjernes fra prøven i stedet for at ønskede celler trekkes ut. Tatt i betraktning oppgavens målsetning er negativ isolering et egnet prinsipp fordi det kan tenkes at cellene som fjernes fra prøven er de som utsettes for størst påvirkning, og at retikulocyttenes RNA derfor ville blitt mer påvirket ved en positiv isolering. Metoden er resultatet av et kompromiss mellom rask prøvebearbeidelse, skånsom behandling av cellene og presis isolering. Ekspresjonsanalysen korrigerer for variasjoner i utbyttet fordi ekspresjonen av målgene kvantifiseres relativt til husholdningsgener. Dette betyr i praksis at så lenge den bearbeidede prøven inneholder nok materiale til analysen, har variasjoner i utbyttet mindre betydning. Fjerning av de cellene som kan innvirke på analysen er det viktigste, og dette oppnås gjennom filtreringens høye effektivitet i fjerning av leukocytter.

Dersom man skulle legge ressurser i ytterligere validering og dokumentasjon av filtreringsmetoden, ville det være interessant å undersøke om selve filtreringen har noen innvirkning på degradering av intracellulært RNA, og om dette kan påvirke analyseresultatene.

5.2 Pasientstudie

Det er i denne hovedfagsoppgaven gjennomført en studie på ekspresjonsendringer av *IMPDH I* og *IMPDH II* hos nyretransplanterte pasienter under MPA-behandling. Elleve pasienter fikk MPA som en del av den immunsuppressive behandlingen, og to fikk ikke MPA. Alle ble fulgt fra noen dager før transplantasjon til og med ca to uker etter.

5.2.1 Om presentasjon av resultatene

Grupperingen av prøvetidspunkter, som forklart i 4.2.1 ble gjort for å gi et helhetlig bilde av ekspresjonsendringene. Prøvetidspunktene i forhold til transplantasjonen var forskjellig fra pasient til pasient. Dette gjorde det vanskelig å sammenligne analyseresultatene direkte mellom pasienter. Analyseresultatene i var også til dels svingende fra prøve til prøve (se Appendiks). I en graf som viser relativ ekspresjon ved alle prøvetidspunkter hos en pasient, kan spesielt høye eller lave verdier for relativ ekspresjon ta bort oppmerksomheten fra helheten i utviklingen. Særlig for retikulocytprøvene, hvor flere prøver ga Cp-verdier over 35 i analysene, bør man ikke legge for stor vekt på de ekstreme verdiene. Grupperingen med median som tilnæringsverdi korrigerer for slike ekstreme verdier. Tilnærmingen kan imidlertid overskygge viktige svingninger i ekspresjonen.

5.2.2 Ekspresjonsendringer hos pasienter som fikk MPA

Resultatene fra pasienter som fikk MPA viser at ekspresjonen av genene for begge isoformer av *IMPDH* påvirkes i særlig stor grad i tidsrommet rett før til rett etter transplantasjonen. Ekspresjonen av *IMPDH I* øker, mens det skjer en reduksjon i ekspresjonen av *IMPDH II*. Det kan være nærliggende å tro at disse endringene kan ha sammenheng med selve transplantasjonsinngrepet og med store doser kortikosteroider. Man vet at kortikosteroider kan påvirke genekspresjon på transkripsjonsnivå (38), men det er ukjent om og hvordan *IMPDH*-genene kan påvirkes. Hvis de observerte endringene omkring transplantasjonstidspunktet i denne studien er reelle og hvis endringene skyldes en steroideffekt, kan det tenkes at kortikosteroider i høye doser virker induserende på ekspresjonen av *IMPDH I* og hemmende på ekspresjonen

av *IMPDH II*. Dette er en hypotese generert av resultatene i studien så langt. Et større materiale er nødvendig for at en slik sammenheng skal kunne dokumenteres sikkert. Den initiale økningen av *IMPDH I* og reduksjonen av *IMPDH II* kan også tenkes å skyldes oppstart av MPA-behandling. Hvis MPA alene gir disse utslagene er det imidlertid vanskelig å forklare den videre utviklingen i ekspresjonen. De tidlige endringene kan være en kombinert effekt av MPA-behandling, steroider og selve inngrepet.

Ekspresjonsendringene fra noen dager etter transplantasjon og videre i forløpet er mindre markante enn endringene i starten. *IMPDH I* opprettholdes på et forhøyet nivå eller avtar svakt, mens *IMPDH II*-kurvene begynner å stige. Hvis man ser disse endringene i sammenheng med steroiddosene, kan det tolkes som at en eventuell steroideffekt avtar på grunn av avtagende doser. På dette stadiet er også MPA-behandlingen godt i gang. I den grad MPA påvirker ekspresjonen av *IMPDH II*, kan det være snakk om en induserende effekt som manifesteres når steroideffekten avtar. Hos retikulocytterne øker *IMPDH II* så mye igjen at nivået to uker etter transplantasjon er høyere enn nivået før transplantasjon. I fullblodceller er ekspresjonsnivået av *IMPDH II* litt lavere to uker etter transplantasjon enn den var før. Hvis denne økningen i retikulocytter skyldes MPA, kan det tyde på at legemidlet i større grad påvirker ekspresjonen av *IMPDH II* i retikulocytter enn i andre blodceller. Ettersom retikulocytterne ikke selv syntetiserer RNA, men har med seg preformert mRNA fra forstadier i beinmargen, må eventuelle endringer i ekspresjonen skje før retikulocytterne slipper ut i sirkulasjonen. Endringene i ekspresjonen vil i så fall gradvis bli synlige i fullblodlysat, etterhvert som sirkulerende erythrocytter som ikke var påvirket av MPA på benmargsstadiet blir skiftet ut med nye erythrocytter som har fått en slik påvirkning.

5.2.3 Ekspresjonsendringer hos pasienter som ikke fikk MPA

Ekspresjonen av *IMPDH I* i fullblod endret seg på samme måte i starten hos pasientene uten MPA-behandling som hos pasientene med MPA-behandling. Dette kan tyde på at MPA har lite med den initiale endringen å gjøre, og at steroider eller selve inngrepet spiller en større rolle. Den etterfølgende reduksjonen avviker fra den generelle tendensen hos pasienter under MPA-behandling, selv om det også i den pasientgruppen

var noen pasienter med avtagende ekspresjon av *IMPDH I* utover i forløpet. Når det gjelder *IMPDH II* er det vanskelig å tolke noe ut av resultatene, men pasient 002 hadde i likhet med pasienter under MPA-behandling en initial reduksjon. I denne sammenligningen må man være spesielt oppmerksom på at det kun foreligger data fra to pasienter som ikke er behandlet med mykofenolat.

5.2.4 Ekspresjonsendringer ved rejeksjonsbehandling

Resultater fra de pasientene som fikk rejeksjonsbehandling viser at ekspresjonen av *IMPDH II* i fullblodceller avtar i løpet av rejeksjonsbehandlingen. En forklaring kan være at ekspresjon av *IMPDH II* reduseres som følge av de høye steroiddosene. Det kan dessuten være andre faktorer i forbindelse med selve rejeksjonen som spiller inn.

5.2.5 Ekspresjon i relasjon til enzymaktivitet

Hos den ene pasienten hvor det forelå resultater fra aktivitetsmåling av *IMPDH* er det påfallende hvordan endringer i aktiviteten sammenfaller med endringer i ekspresjon av *IMPDH II*. Hvis denne tendensen viser seg å være reell hos flere pasienter, kan det tyde på en relasjon mellom enzymaktiviteten og ekspresjon. I fortsettelsen av studien vil aktiviteten både i fullblod og CD4+ celler bli analysert, ettersom det er samlet inn prøvemateriale til disse analysene fra alle pasientene. Da vil man antakelig kunne få inntrykk av om det er en reell sammenheng mellom enzymaktivitet og ekspresjon av *IMPDH II*. Én pasient er for lite grunnlag til å vurdere en slik sammenheng.

Vi vet ikke hvordan ekspresjonsendringer slår ut i endring av absolutt aktivitet for de to isoenzymene i forhold til hverandre. Hvis for eksempel *IMPDH* type I har minimal aktivitet og type II har høy aktivitet, så vil ikke doblet ekspresjon av *IMPDH I* komme til syne i den totale aktiviteten, mens en liten endring i ekspresjon av *IMPDH II* kan gi store utslag.

5.2.6 *Bruk av referansegener*

I relativ kvantitativ ekspresjonsanalyse relateres ekspresjon av målgen til ekspresjon av ett eller flere referansegener med definerte egenskaper. Viktigste egenskap er vanligvis at ekspresjonen er upåvirkelig av aktuelle endringer i betingelsene under studien. På denne måten kompenseres det for ulike mengder total-RNA fra prøve til prøve og for forskjeller i effektivitet i de ulike analysetrinnene. Husholdningsgener antas å ha jevn ekspresjon under varierende betingelser. Imidlertid er det ingen gener hvis ekspresjon er helt upåvirkelig av andre faktorer. Valget av referansegener er dermed både viktig og vanskelig (31). Brukes det bare ett husholdningsgen blir metoden sårbar hvis ekspresjonen av dette ene genet skulle påvirkes av en eller annen faktor i observasjonsperioden. Hvis man skulle benyttet bare ett husholdningsgen som referanse i denne studien, ville det vært nødvendig å bevise at dette ene referansegenets ekspresjonsnivå virkelig er upåvirket av steroider, MPA og alle øvrige forhold relatert til transplantasjonen. Det er i stedet benyttet tre ulike husholdningsgener som referansegen. For å redusere sannsynligheten for koregulering av referansegenene, ble det valgt husholdningsgener fra to ulike funksjonelle klasser. *ALAS* og *G6PDH* koder for enzymer som inngår i metabolske prosesser og *β 2M* koder for et strukturelt protein.

Ekspresjonen av *IMPDH I* og *II* er relatert til en indeks basert på ekspresjonen av alle de tre referansegenene. Dette er hensiktsmessig som kompensasjon for eventuelle endringer i ekspresjonen av ett eller flere av disse husholdningsgenene. Figur 12 i 4.2.6 illustrerer hvordan ekspresjon av målgenene kan relateres til referansegenene enkeltvis og til deres felles indeks, det vil si den sammenfattede husholdningsgenindeks som beregnes i REST-384®. I figuren sammenfattes ekspresjonen av *IMPDH I* og *II* hos én enkelt pasient med hvert av de tre referansgenene for seg, og med husholdningsgenindeksen. Kurvenes samsvarende forløp og utseende viser at ekspresjonen av *IMPDH II* endres på samme måte relativt til hvert av de tre referansegenene; ekspresjonen reduseres til omtrent en tredjedel de første døgnene etter transplantasjonen relativt til ekspresjonen før transplantasjonen. Deretter stiger ekspresjonen noe, men når ikke opp til utgangspunktet. Ekspresjonen av *IMPDH II* relativt til husholdningsgenindeksen viser samme forhold. Man ser her at uansett hvilket av de tre referansegenene man hadde brukt, eller om man hadde brukt REST-indeksen, ville resultatet av den relative ekspresjonen blitt det samme. Enten reguleres de aktuelle

referansegene ikke, eller kun i minimal grad, under studiebetingelsene, eller så reguleres de alle på samme måte og i samme grad, og på en måte som avviker fra reguleringen av *IMPDH II*.

For *IMPDH I* er bildet tilsvarende, med et mulig lite unntak. Når ekspresjonen av *IMPDH I* relateres til referansegene, sees en omtrentlig dobling relativt til *G6PDH* de første par dagene etter transplantasjonen, men man ser en firedobling relativt til *ALAS* og *$\beta 2M$* . Dette kan være uttrykk for at en eller flere faktorer omkring transplantasjonstidspunktet enten regulerer *G6PDH* noe i samme retning som *IMPDH I*, og/eller at *ALAS* og *$\beta 2M$* reguleres noe i motsatt retning. Uansett vil bruken av den gjennomsnittlige REST-indeksen være med på å redusere eventuelle effekter av endret ekspresjon hos enkeltvis referansegene. Etter de første par dagene etter transplantasjonen, synes imidlertid de relative ekspresjonsendringene for *IMPDH I* å bli omtrent de samme uansett hvilket referansegene som brukes eller om man bruker REST-indeksen.

Det at referansegene som er valgt er mye brukte referansegene, og at alle de tre kurvene for normalisert ratio målgen mot de tre husholdningsgenene har samme form, taler sterkt for at endringene skjer i målgen og ikke i referansegene. Normalisering av relativ genekspresjon mot et knippe referansegene er hensiktsmessig og nøytraliserer eventuelle ekspresjonsavvik i referansegene enkeltvis. REST-384® er et egnet verktøy for å beregne en slik felles husholdningsgenindeks for relativ ekspresjon. Siden kurven med relativ ekspresjon beregnet i REST-384® også har tilsvarende form, kan man konkludere med at bruk av dette verktøyet var hensiktsmessig i denne sammenhengen. Dersom ett av genene hadde blitt vesentlig regulert i løpet av observasjonsperioden, ville kurven til dette genet avveket fra de andre kurvene. Et slik avvik ville også kunne bidra vesentlig til endret inntrykk av den ekspresjonen relatert til de tre genene samlet. Figuren viser at størrelsen på utslagene i relativ ekspresjonsendring avhenger av hvilket husholdningsgen man bruker. *G6PDH* gir minst utslag. Ved å utelate dette genet ville utslagene i relativ ekspresjon sett større ut.

5.2.7 Kvantitativ vurdering av genspesifikt mRNA-innhold i retikulocytter

Beregningene i 4.2.5 viser at retikulocyttenes mRNA for genene som undersøkes utgjør anslagsvis 2 til 8 % av mRNA-mengden i fullblod, men dette varierer fra prøve til prøve. Resten av fullblodets spesifikke mRNA må hovedsakelig befinne seg i de kjerneholdige leukocytterne. Ettersom antall retikulocytter er høyere enn antall leukocytter i fullblod, betyr dette at hver retikulocytt inneholder betydelig mindre mRNA enn de større leukocytterne, som dessuten kontinuerlig utfører transkripsjon.

5.2.8 Sammenheng mellom ekspresjonsendringer og MPA-behandling

Sett at hypotesen om at oppregulert enzymaktivitet henger sammen med oppregulert ekspresjon stemmer, og at det faktisk skjer en gradvis og konstant økning i ekspresjon som følge av MPA-behandling. Sett også at ekspresjonen raskt responderer på høye steroiddoser. Da kan det tenkes at endringene som skjer på grunn av steroidene maskerer den gradvise ekspresjonsøkningen som skyldes MPA. Hvis man, rent hypotetisk, hadde ”fjernet” de steroid-induserte endringene, ville kanskje ekspresjonsanalysen vist en jevn økning i ekspresjonen i hele observasjonsperioden.

Mykofenolat inngår i det mest vanlige behandlingsregimet etter nyretransplantasjon i Norge. Derfor fikk de fleste av pasientene i studien dette legemidlet. Analyseresultatene gir inntrykk av mulige trender, men pasientgrunnlaget er for lite til å kunne trekke konklusjoner. For å kunne vurdere hvorvidt det er noen sammenheng mellom de ekspresjonsendringer man har sett og MPA-behandling, vil det være nødvendig å se på resultater fra flere pasienter som ikke får MPA. I tillegg må relasjonen til steroiddosering utredes videre, for eksempel ved å se på ekspresjonsendringer hos flere pasienter under rejeksjon der det gis store doser steroider. Denne pasientstudien er i hovedsak en ”hypotese-genererende” studie. Den gir et grunnlag for videre arbeid med utredning av MPA sin påvirkning av genespresjon.

6 KONKLUSJON

I denne hovedfagsoppgaven ble det utviklet en metode for å isolere retikulocytter fra fullblod slik at cellematerialet er egnet for ekspresjonsanalyse av *IMPDH I* og *IMPDH II*. Prinsippet for metoden er at uønskede celler, det vil si leukocytter og delvis trombocytter, fjernes fra fullblod ved filtrering gjennom en cellulosekolonne slik at bare de røde blodlegemene er igjen. Ekspresjonsanalyse av bearbeidet prøvemateriale gjenspeiler retikulocyttenes mRNA-innhold fordi modne erytrocytter verken utøver proteinsyntese eller inneholder mRNA. Metoden gir tilstrekkelig utbytte av retikulocytter og effektiv eliminering av leukocytter.

Det ble gjennomført en studie av endringer i ekspresjon av *IMPDH I* og *IMPDH II* i retikulocytter og fullblodceller hos nyretransplanterte under MPA-behandling. Resultatene viser at det er betydelige endringer i ekspresjon av begge genene i tiden rundt transplantasjon og de første par uker postoperativt, både i fullblod og i retikulocytter. *IMPDH I*-ekspresjonen øker i starten før den enten stabiliseres eller avtar noe. Ekspresjon av *IMPDH II* avtar i starten før den oppreguleres noe eller stabiliseres utover i forløpet.

For å vurdere hvorvidt de observerte ekspresjonsendringene kan relateres til MPA-behandlingen, trengs analyseresultater fra flere pasienter som ikke får MPA. Pasientstudien fortsetter etter at denne hovedfagsoppgaven er avsluttet, og det vil til sammen bli rekruttert minst 30 pasienter. De samlede resultatene for hele studien vil gi et bedre grunnlag for vurderinger omkring årsakene til ekspresjonsendringer.

7 REFERANSER

1. Vartdal, F., Thorsby, E. (1999). "Immunologic reactions in transplantation." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 119: 3167-3170.
2. Bogen, B., Munthe, A. (2000). "*Immunologi.*" 1.ed. Oslo: Universitetsforlaget.
3. Reisæter, A.V. (1999). "Kidney transplantation in Norway – a historical perspective." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 119: 3163-3166.
4. Albrechtsen, D., Leivestad, T., Brekke, I., Fauchald, P., Pfeffer, P., Thorsby, E. (2004). "Experience with cyclosporine in 1519 kidney transplantations from living donors in a national transplant programme, 1983-2002." *Transplant Proc.* 36: 89S-93S.
5. Joosten, S.A., Sijpkens, Y.W., van Kooten, C., Paul, L.C. (2005). "Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations." *Kidney Int.* 68: 1-13.
6. Bergan, S., Albrechtsen, D., Bentdal, Ø. (1999). "Immunosuppressive agents in organ transplantation." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 119: 3615-3620.
7. Taylor, A.L., Watson, C.J., Bradley, J.A. (2005). "Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy." *Crit Rev Oncol Hematol.* 56: 23-46.
8. Nashan, B., Bock, A., Bosmans, J.L., Budde, K., Fijter, H., Jaques, B., Johnston, A., Lück, R., Midtvedt, K., Pallardó, L.M., Ready, A., Salamé, E., Salizzoni, M., Suarez, F., Therivet, E. (2005). "Use of Neoral C monitoring: a European consensus." *Transpl Int.* 18: 768-778.
9. Harboe, E., Gøransson, L., Wildhagen, K., Omdal, R. (2005). "Mycophenolate mofetil – a new therapeutic agent for chronic autoimmune diseases." *Tidsskr Nor Laegeforen.* 125: 1650-1652.
10. Bullingham, R., Monroe, S., Nicholls, A., Hale, M. (1996). "Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration." *J Clin Pharmacol.* 36: 315-324.
11. Bullingham, R.E., Nicholls, A.J., Kamm, B.R. (1998). "Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil." *Clin Pharmacokinet.* 34: 429-455.
12. Anonymous. (2001). "*The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.*" 13.ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co.

13. Shipkova, M., Armstrong, V.W., Wieland, E., Niedmann, P.D., Schütz, E., Brenner-Weiss, G., Voihsel, M., Braun, F., Oellerich, M. (1999). "Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil." *Br J Pharmacol.* 126: 1075-1082.
14. Picard, N., Cresteil, T., Prémaud, A., Marquet, P. (2004). "Characterization of a Phase 1 Metabolite of Mycophenolic Acid Produced by CYP3A4/5." *Ther Drug Monit.* 26: 600-608.
15. Schütz, E., Shipkova, M., Armstrong, V.W., Wieland, E., Oellerich, M. (1999). "Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil." *Clin Chem.* 45: 419-422.
16. Allison, A.C., Eugui, E.M. (1996). "Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF)." *Clin Transplant.* 10: 77-84.
17. Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G., Suzuki, K. (1990). "Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase." *J Biol Chem.* 265: 5292-5295.
18. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., Natsumeda, Y. (1993). "Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases." *J Biol Chem.* 268: 27286-27290.
19. Shaw, L.M., Holt, D.W., Oellerich, M., Meiser, B., van, G.T. (2001). "Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion." *Ther Drug Monit.* 23: 305-315.
20. Vethe, N.T., Mandla, R., Line, P.-D., Midtvedt, K., Hartmann, A., Bergan, S. (2005). "Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment [Accepted]." *Scand J Clin Lab Invest.*
21. Bremer, S. (2004). "IMPDH type I og II i blodceller: Utvikling, validering og etablering av relativ kvantitativ RT-PCR analyse. Ekspresjonsendringer hos nyretransplanterte under mykofenolatbehandling." Oslo: Klinisk-kjemisk avd, Rikshospitalet og Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
22. Houwen, B. (1992). "Reticulocyte maturation." *Blood Cells.* 18: 167-186.
23. Benestad, H.B. (2005). "Blodcellenes fysiologi: Livsløp, funksjoner og regulering." *Kompendium.* 1-62. Oslo: Universitetet i Oslo.

24. Brun, A., Gaudernack, G., Sandberg, S. (1990). "A new method for isolation of reticulocytes: positive selection of human reticulocytes by immunomagnetic separation." *Blood*. 76: 2397-2403.
25. Roitt, I.M., Delves, P.J. (2001). "*Roitt's essential immunology*." 10.ed. Oxford: Blackwell Science.
26. Fleming, A. (1926). "A simple method of removing leucocytes from blood." *Br J Exp Pathol*. 7: 281-286.
27. Beutler, E., West, C., Blume, K.G. (1976). "The removal of leukocytes and platelets from whole blood." *J Lab Clin Med*. 88: 328-333.
28. Beutler, E., Gelbart, T. (1986). "The mechanism of removal of leukocytes by cellulose columns." *Blood Cells*. 12: 57-64.
29. Anonymous. (2003). "Dynabeads Pan Mouse IgG." *Package Insert*. Oslo: Dynal Biotech.
30. Rainen, L., Oelmueller, U., Jurgensen, S., Wyrich, R., Ballas, C., Schram, J., Herdman, C., Bankaitis-Davis, D., Nicholls, N., Trollinger, D., Tryon, V. (2002). "Stabilization of mRNA expression in whole blood samples." *Clin Chem*. 48: 1883-1890.
31. Anonymous. (2002). "Selection of Housekeeping Genes (LightCycler)." *Technical Note*. No. LC 15/2002: 1-20. Roche Applied Science.
32. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res*. 30: e36.
33. Anonymous. (2001). "Relative quantification (LightCycler)." *Technical Note*. No. LC 13/2001: 1-28. Roche Applied Science.
34. Albrecht, W., Storck, M., Pfetsch, E., Martin, W., Abendroth, D. (2000). "Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells." *Ther Drug Monit*. 22: 283-294.
35. Seligman, P.A., Allen, R.H., Kirchanski, S.J., Natale, P.J. (1983). "Automated analysis of reticulocytes using fluorescent staining with both acridine orange and an immunofluorescence technique." *Am J Hematol*. 14: 57-66.

36. Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J.P., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J. (1987). "Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets." *Eur J Biochem.* 164: 189-195.
37. Rox, J.M., Bugert, P., Müller, J., Schorr, A., Hanfland, P., Madlener, K., Klüter, H., Pötzsch, B. (2004). "Gene expression analysis in platelets from a single donor: evaluation of a PCR-based amplification technique." *Clin Chem.* 50: 2271-2278.
38. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (1999). "*Pharmacology.*" 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

APPENDIKS

Analyseresultater fra pasientstudien

Pasient 001

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | $\beta 2M$ | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,11 | 31,88 | 33,47 | 25,03 | 31,84 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,1 | 32,37 | 31,91 | 33,97 | 25,39 | 31,20 | 0,44 | 1,04 |
| | -3,2 | 35,24 | 33,78 | 36,36 | 26,62 | 33,41 | 0,22 | 1,11 |
| | -3,0 | 35,87 | 34,23 | 37,10 | 27,04 | 34,54 | 0,24 | 1,38 |
| | 0,8 | 33,97 | 35,22 | 35,53 | 26,21 | 32,19 | 0,31 | 0,24 |
| | 1,8 | 33,70 | 33,74 | 34,63 | 25,72 | 31,60 | 0,24 | 0,41 |
| | 2,8 | 30,75 | 31,44 | 32,49 | 23,84 | 29,67 | 0,48 | 0,50 |
| | 3,8 | 31,11 | 32,18 | 33,21 | 24,24 | 29,49 | 0,46 | 0,38 |
| | 8,8 | 28,62 | 29,59 | 30,37 | 21,67 | 26,14 | 0,35 | 0,29 |
| | 13,8 | 30,90 | 30,68 | 31,68 | 22,85 | 27,57 | 0,18 | 0,34 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,99 | 31,79 | 33,64 | 24,72 | 31,97 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,1 | 30,13 | 30,92 | 32,19 | 21,75 | 29,56 | 0,77 | 0,37 |
| | -3,2 | 30,51 | 31,01 | 32,13 | 21,82 | 29,77 | 0,62 | 0,37 |
| | -3,0 | 29,66 | 30,21 | 31,29 | 21,48 | 29,00 | 0,71 | 0,41 |
| | 0,8 | 29,27 | 32,47 | 32,02 | 22,29 | 29,39 | 1,47 | 0,14 |
| | 1,8 | 28,63 | 30,47 | 31,04 | 21,08 | 28,81 | 1,21 | 0,28 |
| | 2,8 | 30,16 | 32,38 | 32,37 | 22,64 | 30,04 | 1,08 | 0,20 |
| | 3,8 | 29,56 | 31,52 | 31,71 | 22,07 | 29,81 | 1,17 | 0,25 |
| | 8,8 | 27,43 | 28,61 | 29,52 | 19,97 | 26,66 | 0,94 | 0,33 |
| | 13,8 | 26,67 | 27,07 | 28,45 | 19,16 | 26,08 | 0,91 | 0,54 |

tx = transplantasjon

Pasient 002

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | $\beta 2M$ | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | |
| Kalibrator | - | 32,13 | 32,47 | 34,06 | 25,38 | 32,67 | 1,00 | 1,00 | |
| Prøver | -2,0 | 33,70 | 33,18 | 34,95 | 26,04 | 32,08 | 0,41 | 0,77 | |
| | -1,3 | 33,77 | 34,05 | 35,49 | 26,46 | 32,48 | 0,54 | 0,59 | |
| | -1,1 | 35,20 | 34,35 | 36,49 | 26,67 | 33,04 | 0,30 | 0,72 | |
| | 0,7 | 31,60 | 33,17 | 33,54 | 24,88 | 30,19 | 0,65 | 0,28 | |
| | 1,7 | 32,76 | 34,37 | 35,29 | 26,47 | 31,68 | 0,88 | 0,38 | |
| | 5,7 | 31,28 | 32,33 | 33,38 | 24,44 | 28,74 | 0,51 | 0,31 | |
| | 6,7 | 30,79 | 32,39 | 32,66 | 23,78 | 27,10 | 0,36 | 0,15 | |
| | 8,7 | 29,63 | 31,27 | 31,71 | 23,08 | 27,22 | 0,57 | 0,22 | |
| | | 13,7 | 29,50 | 31,54 | 31,52 | 22,85 | 27,17 | 0,56 | 0,17 |
| | FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,99 | 32,11 | 33,71 | 25,02 | 32,68 | 1,00 | 1,00 | |
| Prøver | -2,0 | 29,41 | 30,68 | 31,54 | 21,78 | 28,55 | 0,68 | 0,30 | |
| | -1,3 | 29,30 | 29,97 | 31,16 | 22,00 | 28,38 | 0,68 | 0,44 | |
| | -1,1 | 28,62 | 29,39 | 30,58 | 21,22 | 27,65 | 0,68 | 0,41 | |
| | 0,7 | 28,89 | 31,51 | 31,79 | 22,79 | 28,17 | 1,21 | 0,21 | |
| | 1,7 | 27,22 | 29,00 | 29,57 | 20,90 | 26,69 | 1,07 | 0,31 | |
| | 5,7 | 29,15 | 31,98 | 31,62 | 22,29 | 27,92 | 0,81 | 0,12 | |
| | 6,7 | 29,20 | 30,58 | 31,41 | 21,09 | 28,67 | 0,67 | 0,27 | |
| | 8,7 | 27,75 | 28,95 | 29,69 | 19,98 | 26,65 | 0,60 | 0,27 | |
| | 13,7 | 26,12 | 27,82 | 28,19 | 19,51 | 25,11 | 0,85 | 0,26 | |

Pasient 003

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,78 | 31,61 | 33,56 | 25,27 | 32,06 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 33,21 | 32,57 | 34,63 | 25,64 | 31,71 | 0,47 | 0,67 |
| | -1,1 | 33,47 | 33,00 | 35,23 | 26,21 | 32,48 | 0,62 | 0,78 |
| | -0,9 | 34,43 | 34,60 | 36,33 | 26,54 | 28,83 | 0,19 | 0,16 |
| | 0,9 | 29,93 | 32,21 | 32,48 | 23,69 | 28,83 | 0,95 | 0,17 |
| | 1,9 | 30,47 | 32,81 | 33,34 | 24,95 | 29,96 | 1,38 | 0,24 |
| | 4,9 | 34,60 | 35,70 | 35,57 | 27,11 | 30,79 | 0,25 | 0,11 |
| | 6,9 | 32,54 | 33,04 | 33,66 | 25,66 | 29,03 | 0,33 | 0,21 |
| | 11,9 | 29,59 | 31,26 | 32,44 | 24,00 | 29,04 | 1,35 | 0,37 |
| | 13,9 | 31,66 | 31,93 | 33,64 | 24,94 | 30,47 | 0,71 | 0,53 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 32,53 | 32,42 | 33,94 | 25,28 | 32,52 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 28,82 | 30,17 | 30,92 | 22,00 | 28,14 | 1,16 | 0,40 |
| | -1,1 | 28,65 | 29,68 | 30,67 | 21,36 | 27,94 | 1,02 | 0,43 |
| | -0,9 | 27,71 | 29,89 | 30,10 | 21,09 | 26,92 | 1,28 | 0,24 |
| | 0,9 | 27,38 | 30,14 | 30,21 | 21,61 | 27,01 | 1,92 | 0,24 |
| | 1,9 | 28,61 | 30,93 | 31,03 | 21,49 | 28,61 | 1,37 | 0,24 |
| | 4,9 | 29,62 | 31,95 | 31,90 | 22,21 | 29,66 | 1,23 | 0,22 |
| | 6,9 | 29,55 | 31,06 | 31,78 | 22,46 | 29,00 | 1,15 | 0,36 |
| | 11,9 | 29,18 | 31,20 | 31,54 | 22,81 | 28,49 | 1,36 | 0,30 |
| | 13,9 | 28,07 | 29,73 | 30,51 | 20,76 | 27,88 | 1,26 | 0,35 |

Pasient 004

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | |
| Kalibrator | - | 31,59 | 31,48 | 33,38 | 24,54 | 31,99 | 1,00 | 1,00 | |
| Prøver | -2,2 | 30,90 | 31,73 | 32,01 | 23,37 | 28,60 | 0,42 | 0,22 | |
| | -1,4 | 34,87 | 34,55 | 34,82 | 26,32 | 30,92 | 0,17 | 0,20 | |
| | -1,2 | 32,57 | 34,12 | 33,54 | 24,40 | 29,72 | 0,30 | 0,10 | |
| | 0,0 | 31,58 | 34,03 | 33,30 | 24,42 | 29,11 | 0,50 | 0,09 | |
| | 2,6 | 33,18 | 34,15 | 34,41 | 25,10 | 29,64 | 0,28 | 0,14 | |
| | 3,6 | 29,90 | 30,93 | 31,83 | 22,79 | 27,93 | 0,61 | 0,27 | |
| | 4,6 | 31,49 | 32,28 | 33,45 | 24,98 | 29,91 | 0,76 | 0,41 | |
| | 9,6 | 31,22 | 34,44 | 33,87 | 24,84 | 30,11 | 1,02 | 0,10 | |
| | | 13,6 | 29,27 | 30,08 | 31,12 | 22,53 | 27,77 | 0,73 | 0,37 |
| | FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 33,51 | 31,58 | 31,62 | 24,39 | 32,07 | 1,00 | 1,00 | |
| Prøver | -2,2 | 28,25 | 28,95 | 30,05 | 20,74 | 28,09 | 4,83 | 0,73 | |
| | -1,4 | 27,54 | 28,11 | 29,53 | 20,37 | 27,03 | 5,10 | 0,83 | |
| | -1,2 | 27,58 | 29,77 | 30,16 | 20,80 | 26,91 | 6,19 | 0,33 | |
| | 0,0 | 26,05 | 28,32 | 28,98 | 20,19 | 26,20 | 10,16 | 0,50 | |
| | 2,6 | 28,31 | 29,90 | 30,95 | 22,29 | 28,07 | 8,17 | 0,67 | |
| | 3,6 | 27,87 | 29,24 | 30,21 | 21,28 | 27,75 | 6,88 | 0,65 | |
| | 4,6 | 28,11 | 29,65 | 30,57 | 21,34 | 27,92 | 6,68 | 0,56 | |
| | 9,6 | 24,47 | 28,07 | 27,34 | 18,62 | 24,34 | 9,56 | 0,18 | |
| | 13,6 | 26,93 | 27,92 | 29,11 | 20,20 | 26,59 | 6,19 | 0,74 | |

Pasient 006

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,61 | 31,94 | 33,30 | 24,66 | 31,89 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 32,38 | 33,19 | 34,29 | 25,10 | 30,95 | 0,66 | 0,48 |
| | -1,2 | 33,20 | 34,09 | 34,68 | 25,75 | 31,00 | 0,48 | 0,34 |
| | -0,9 | 33,91 | 34,69 | 35,64 | 25,86 | 31,25 | 0,39 | 0,30 |
| | 0,9 | 28,09 | 31,43 | 30,80 | 22,39 | 27,57 | 1,46 | 0,17 |
| | 3,9 | 32,53 | 33,59 | 34,09 | 25,47 | 30,11 | 0,51 | 0,31 |
| | 4,9 | 34,60 | 35,11 | 35,67 | 26,82 | 31,27 | 0,30 | 0,29 |
| | 5,9 | 31,82 | 32,72 | 33,81 | 24,79 | 29,26 | 0,55 | 0,38 |
| | 12,9 | 27,41 | 28,52 | 29,67 | 21,34 | 26,62 | 1,15 | 0,62 |
| | 14,9 | 29,08 | 29,63 | 31,06 | 22,24 | 27,41 | 0,73 | 0,59 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,86 | 31,75 | 33,42 | 24,71 | 32,21 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 26,96 | 27,74 | 29,16 | 20,38 | 26,78 | 1,24 | 0,61 |
| | -1,2 | 27,25 | 27,98 | 29,29 | 20,78 | 27,01 | 1,21 | 0,62 |
| | -0,9 | 27,33 | 28,91 | 29,73 | 21,12 | 26,92 | 1,34 | 0,39 |
| | 0,9 | 25,65 | 28,48 | 28,39 | 19,69 | 25,57 | 1,68 | 0,20 |
| | 3,9 | 26,89 | 28,61 | 29,26 | 20,55 | 26,87 | 1,42 | 0,37 |
| | 4,9 | 26,67 | 28,37 | 28,94 | 20,97 | 26,49 | 1,55 | 0,41 |
| | 5,9 | 26,80 | 28,12 | 29,18 | 21,01 | 26,66 | 1,57 | 0,53 |
| | 12,9 | 24,91 | 25,80 | 27,00 | 18,62 | 24,66 | 1,30 | 0,57 |
| | 14,9 | 25,10 | 26,09 | 27,51 | 18,92 | 24,94 | 1,47 | 0,61 |

Pasient 007

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,67 | 31,90 | 33,78 | 24,82 | 32,12 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 34,71 | 34,15 | 34,06 | 25,88 | 30,65 | 0,12 | 0,21 |
| | -1,0 | 34,17 | 34,07 | 34,19 | 25,97 | 31,20 | 0,20 | 0,26 |
| | 0,8 | 30,54 | 32,90 | 32,54 | 24,43 | 29,65 | 0,86 | 0,20 |
| | 3,8 | 32,18 | 33,07 | 33,97 | 24,59 | 30,06 | 0,43 | 0,28 |
| | 4,8 | 29,43 | 31,01 | 31,82 | 22,78 | 28,36 | 0,81 | 0,31 |
| | 5,8 | 33,58 | 33,66 | 34,55 | 26,04 | 30,02 | 0,26 | 0,30 |
| | 7,8 | 29,32 | 30,70 | 31,47 | 22,73 | 27,94 | 0,72 | 0,31 |
| | 10,8 | 26,71 | 29,12 | 29,18 | 20,67 | 26,27 | 1,13 | 0,23 |
| | 12,8 | 27,09 | 29,77 | 29,93 | 21,40 | 26,74 | 1,36 | 0,23 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,84 | 32,01 | 33,66 | 24,93 | 32,27 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 28,60 | 28,85 | 30,28 | 21,49 | 28,22 | 0,79 | 0,70 |
| | -1,0 | 29,12 | 29,82 | 30,81 | 22,27 | 28,54 | 0,80 | 0,53 |
| | 0,8 | 26,65 | 28,39 | 29,13 | 20,86 | 26,59 | 1,43 | 0,44 |
| | 3,8 | 28,85 | 30,85 | 31,18 | 22,45 | 28,73 | 1,16 | 0,31 |
| | 4,8 | 28,07 | 29,70 | 30,40 | 21,86 | 27,95 | 1,22 | 0,41 |
| | 5,8 | 29,25 | 30,69 | 31,07 | 23,18 | 28,87 | 1,04 | 0,41 |
| | 7,8 | 26,83 | 28,15 | 29,00 | 19,98 | 26,74 | 1,03 | 0,42 |
| | 10,8 | 26,40 | 27,72 | 28,58 | 19,60 | 25,99 | 0,97 | 0,40 |
| | 12,8 | 27,76 | 30,17 | 30,06 | 21,71 | 27,12 | 1,12 | 0,22 |

Pasient 008

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | <i>β2M</i> | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,92 | 31,81 | 33,69 | 24,92 | 31,99 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 34,91 | 35,75 | 36,24 | 25,88 | 31,76 | 0,26 | 0,15 |
| | -1,1 | 32,82 | 33,70 | 34,28 | 24,60 | 30,40 | 0,39 | 0,20 |
| | -0,9 | 31,26 | 34,02 | 33,59 | 23,81 | 29,30 | 0,65 | 0,09 |
| | 0,9 | 31,15 | 33,51 | 33,51 | 24,13 | 29,22 | 0,73 | 0,13 |
| | 3,9 | 32,80 | 34,78 | 34,73 | 24,27 | 28,97 | 0,30 | 0,07 |
| | 4,9 | 28,61 | 30,92 | 31,01 | 21,79 | 26,61 | 0,78 | 0,14 |
| | 5,9 | 31,42 | 33,30 | 33,42 | 24,70 | 28,38 | 0,56 | 0,14 |
| | 7,9 | 27,85 | 30,29 | 30,67 | 22,13 | 26,63 | 1,34 | 0,22 |
| | 12,9 | 31,23 | 33,57 | 33,14 | 22,95 | 28,54 | 0,41 | 0,08 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,60 | 31,63 | 33,62 | 24,83 | 32,08 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,9 | 26,20 | 28,48 | 28,72 | 20,02 | 26,06 | 1,18 | 0,23 |
| | -1,1 | 28,90 | 30,89 | 31,08 | 22,84 | 28,42 | 1,01 | 0,25 |
| | -0,9 | 27,64 | 30,91 | 30,58 | 21,17 | 26,75 | 1,02 | 0,10 |
| | 0,9 | 27,81 | 29,73 | 30,53 | 20,92 | 28,19 | 1,16 | 0,30 |
| | 3,9 | 25,96 | 27,96 | 28,78 | 19,75 | 25,85 | 1,27 | 0,30 |
| | 4,9 | 27,31 | 29,72 | 29,72 | 20,32 | 27,40 | 0,99 | 0,18 |
| | 5,9 | 27,52 | 29,84 | 29,76 | 21,04 | 26,74 | 0,88 | 0,17 |
| | 7,9 | 27,28 | 29,68 | 29,58 | 20,76 | 26,51 | 0,89 | 0,16 |
| | 12,9 | 26,13 | 28,09 | 28,77 | 19,28 | 25,94 | 1,03 | 0,25 |

Pasient 009

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | <i>β2M</i> | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,55 | 31,60 | 33,65 | 24,76 | 32,09 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,0 | 34,33 | 34,75 | 35,58 | 27,29 | 32,52 | 0,44 | 0,36 |
| | -3,3 | 33,75 | 35,12 | 34,75 | 26,46 | 31,96 | 0,40 | 0,17 |
| | -3,0 | 33,67 | 34,28 | 34,38 | 25,95 | 31,49 | 0,31 | 0,22 |
| | 0,8 | 33,14 | 35,31 | 35,84 | 27,68 | 32,11 | 1,08 | 0,26 |
| | 1,8 | 33,29 | 34,67 | 34,97 | 26,58 | 31,18 | 0,50 | 0,21 |
| | 2,8 | 30,39 | 33,76 | 33,02 | 24,69 | 29,82 | 1,14 | 0,12 |
| | 3,8 | 33,78 | 35,47 | 37,68 | 29,68 | 34,12 | 2,66 | 0,91 |
| | 8,8 | 29,00 | 30,79 | 31,32 | 22,96 | 27,94 | 0,90 | 0,26 |
| | 14,8 | 32,33 | 32,20 | 34,04 | 24,89 | 30,11 | 0,42 | 0,48 |
| | FULLBLODCELLER | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,22 | 31,58 | 33,36 | 24,78 | 32,15 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,0 | 27,19 | 28,46 | 29,57 | 20,95 | 26,99 | 0,89 | 0,44 |
| | -3,3 | 27,08 | 28,64 | 29,59 | 21,00 | 26,81 | 0,94 | 0,38 |
| | -3,0 | 27,20 | 28,57 | 29,34 | 20,77 | 27,00 | 0,80 | 0,37 |
| | 0,8 | 25,71 | 28,66 | 28,77 | 20,07 | 26,27 | 1,45 | 0,22 |
| | 1,8 | 25,45 | 28,16 | 28,66 | 19,99 | 25,77 | 1,49 | 0,27 |
| | 2,8 | 25,99 | 29,03 | 29,25 | 20,34 | 26,30 | 1,43 | 0,21 |
| | 3,8 | 26,77 | 29,09 | 29,69 | 21,02 | 27,07 | 1,27 | 0,31 |
| | 8,8 | 26,17 | 28,28 | 28,94 | 20,81 | 26,14 | 1,26 | 0,35 |
| | 14,8 | 27,21 | 29,67 | 29,87 | 21,87 | 26,99 | 1,17 | 0,26 |

Pasient 010

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,73 | 31,89 | 33,69 | 24,76 | 32,14 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -2,0 | 31,34 | 33,66 | 33,58 | 24,98 | 30,27 | 0,88 | 0,20 |
| | -1,2 | 35,07 | 35,16 | 35,83 | 27,60 | 32,01 | 0,30 | 0,33 |
| | -1,0 | 29,26 | 32,68 | 31,84 | 23,37 | 28,26 | 1,11 | 0,11 |
| | 0,8 | 27,07 | 31,89 | 30,56 | 22,69 | 26,98 | 2,45 | 0,09 |
| | 1,8 | 29,52 | 33,60 | 32,86 | 25,62 | 29,31 | 2,51 | 0,16 |
| | 4,8 | 28,43 | 31,80 | 31,10 | 22,66 | 26,98 | 1,06 | 0,11 |
| | 5,8 | 33,94 | 34,37 | 34,81 | 25,65 | 29,01 | 0,17 | 0,14 |
| | 8,8 | 29,41 | 31,63 | 31,87 | 23,15 | 26,63 | 0,66 | 0,15 |
| | 13,8 | 26,89 | 29,84 | 29,87 | 21,60 | 26,03 | 1,48 | 0,20 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,60 | 31,49 | 33,86 | 24,80 | 32,01 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -2,0 | 26,54 | 26,05 | 29,17 | 19,85 | 26,05 | 0,96 | 1,12 |
| | -1,2 | 26,25 | 27,91 | 28,80 | 19,92 | 26,02 | 1,09 | 0,29 |
| | -1,0 | 26,61 | 29,48 | 29,39 | 20,42 | 25,75 | 1,03 | 0,12 |
| | 0,8 | 27,07 | 30,66 | 30,26 | 21,60 | 26,79 | 1,52 | 0,11 |
| | 1,8 | 24,63 | 27,62 | 27,74 | 18,63 | 24,71 | 1,47 | 0,15 |
| | 4,8 | 26,75 | 29,28 | 29,24 | 20,85 | 26,12 | 1,08 | 0,16 |
| | 5,8 | 26,01 | 27,95 | 28,56 | 20,02 | 25,68 | 1,16 | 0,26 |
| | 8,8 | 25,00 | 27,01 | 27,65 | 19,12 | 24,26 | 1,12 | 0,23 |
| | 13,8 | 25,13 | 27,76 | 28,01 | 19,45 | 24,62 | 1,31 | 0,18 |

Pasient 011

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,97 | 32,24 | 34,05 | 25,41 | 32,29 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -2,2 | 30,87 | 30,59 | 32,15 | 23,78 | 29,71 | 0,53 | 0,75 |
| | -1,2 | 31,92 | 31,26 | 33,37 | 24,19 | 30,13 | 0,41 | 0,77 |
| | -0,9 | 32,02 | 32,81 | 34,16 | 24,71 | 30,61 | 0,58 | 0,40 |
| | 0,8 | 30,89 | 33,76 | 33,39 | 23,72 | 29,03 | 0,59 | 0,10 |
| | 3,8 | 29,96 | 31,10 | 32,06 | 23,08 | 28,68 | 0,66 | 0,35 |
| | 4,8 | 32,60 | 33,21 | 34,39 | 24,43 | 30,52 | 0,37 | 0,30 |
| | 5,8 | 33,92 | 33,99 | 35,82 | 25,41 | 30,93 | 0,28 | 0,34 |
| | 7,8 | 31,20 | 31,54 | 32,93 | 23,92 | 29,32 | 0,48 | 0,45 |
| | 13,8 | 29,44 | 30,50 | 31,04 | 23,06 | 28,47 | 0,71 | 0,40 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,85 | 32,35 | 33,41 | 25,00 | 32,38 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -2,2 | 27,71 | 28,34 | 29,51 | 20,81 | 27,14 | 0,85 | 0,71 |
| | -1,2 | 27,32 | 27,71 | 28,98 | 20,31 | 26,87 | 0,83 | 0,82 |
| | -0,9 | 28,66 | 29,58 | 30,71 | 21,61 | 27,90 | 0,83 | 0,58 |
| | 0,8 | 28,41 | 30,80 | 31,36 | 21,77 | 28,12 | 1,25 | 0,32 |
| | 3,8 | 26,80 | 28,22 | 29,22 | 20,22 | 26,88 | 1,24 | 0,60 |
| | 4,8 | 28,02 | 30,45 | 30,72 | 20,73 | 28,54 | 1,21 | 0,30 |
| | 5,8 | 28,33 | 30,18 | 30,69 | 21,12 | 28,50 | 1,05 | 0,39 |
| | 7,8 | 27,00 | 28,20 | 29,08 | 20,55 | 26,82 | 1,11 | 0,62 |
| | 13,8 | 26,74 | 27,98 | 28,68 | 20,07 | 26,35 | 0,98 | 0,53 |

Pasient 012

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,96 | 32,40 | 34,27 | 25,61 | 31,89 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 34,20 | 34,18 | 34,56 | 25,78 | 30,47 | 0,17 | 0,24 |
| | 0,0 | 35,55 | 35,57 | 34,47 | 25,87 | 30,65 | 0,07 | 0,10 |
| | 0,8 | 30,24 | 33,92 | 32,15 | 23,97 | 28,53 | 0,65 | 0,07 |
| | 1,8 | 31,77 | 34,74 | 32,75 | 24,69 | 29,07 | 0,34 | 0,06 |
| | 4,8 | 32,35 | 33,73 | 33,72 | 24,85 | 29,18 | 0,30 | 0,16 |
| | 5,8 | 34,86 | 35,81 | 34,79 | 25,46 | 29,33 | 0,08 | 0,06 |
| | 6,8 | 34,35 | 34,97 | 33,99 | 24,74 | 28,72 | 0,07 | 0,06 |
| | 8,8 | 31,91 | 32,77 | 32,85 | 23,53 | 28,18 | 0,20 | 0,15 |
| | 13,8 | 27,59 | 29,67 | 29,43 | 21,22 | 25,69 | 0,61 | 0,18 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,76 | 32,29 | 33,73 | 25,20 | 32,51 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 28,54 | 29,34 | 30,60 | 21,59 | 27,89 | 0,70 | 0,54 |
| | 0,0 | 28,80 | 29,24 | 30,42 | 21,83 | 28,29 | 0,65 | 0,65 |
| | 0,8 | 28,38 | 31,24 | 30,99 | 22,48 | 28,19 | 1,13 | 0,22 |
| | 1,8 | 29,08 | 31,17 | 31,20 | 23,23 | 28,80 | 0,99 | 0,33 |
| | 4,8 | 28,58 | 31,04 | 30,79 | 22,59 | 28,52 | 1,04 | 0,26 |
| | 5,8 | 28,80 | 31,84 | 31,04 | 21,96 | 28,74 | 0,85 | 0,14 |
| | 6,8 | 29,69 | 32,42 | 31,20 | 22,15 | 29,18 | 0,55 | 0,12 |
| | 8,8 | 29,14 | 30,64 | 30,53 | 22,54 | 28,62 | 0,67 | 0,33 |
| | 13,8 | 27,04 | 28,54 | 28,24 | 20,42 | 26,21 | 0,60 | 0,28 |

Pasient 013

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | β 2M | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,83 | 31,89 | 33,80 | 25,00 | 31,81 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,0 | 35,60 | 36,02 | 34,95 | 25,01 | 30,69 | 0,07 | 0,06 |
| | -3,2 | 29,95 | 30,39 | 31,57 | 22,71 | 28,02 | 0,56 | 0,41 |
| | -3,0 | 31,62 | 31,90 | 32,50 | 23,86 | 28,99 | 0,35 | 0,30 |
| | 0,8 | 35,54 | 35,64 | 32,94 | 24,80 | 29,52 | 0,03 | 0,04 |
| | 1,8 | 32,80 | 34,02 | 32,95 | 24,76 | 29,19 | 0,22 | 0,10 |
| | 2,8 | 29,49 | 31,38 | 31,54 | 23,12 | 27,84 | 0,80 | 0,22 |
| | 8,8 | 30,27 | 30,61 | 31,70 | 22,95 | 27,94 | 0,47 | 0,38 |
| | 10,8 | 33,50 | 33,17 | 33,78 | 24,61 | 29,42 | 0,16 | 0,22 |
| | 15,8 | 30,90 | 31,73 | 31,85 | 23,39 | 27,83 | 0,34 | 0,20 |
| | FULLBLODCELLER | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,62 | 31,93 | 33,87 | 25,24 | 32,33 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -4,0 | 26,83 | 28,09 | 28,51 | 20,22 | 26,19 | 0,64 | 0,30 |
| | -3,2 | 27,13 | 27,94 | 28,86 | 20,16 | 26,58 | 0,61 | 0,39 |
| | -3,0 | 28,54 | 29,38 | 30,18 | 21,59 | 27,77 | 0,56 | 0,37 |
| | 0,8 | 26,26 | 28,85 | 29,15 | 20,54 | 25,89 | 1,12 | 0,21 |
| | 1,8 | 26,97 | 29,09 | 29,55 | 20,53 | 26,69 | 0,89 | 0,23 |
| | 2,8 | 26,94 | 28,92 | 29,10 | 20,80 | 26,36 | 0,81 | 0,24 |
| | 8,8 | 27,00 | 28,56 | 29,24 | 19,91 | 26,47 | 0,67 | 0,26 |
| | 10,8 | 26,16 | 27,57 | 28,21 | 19,71 | 25,48 | 0,72 | 0,31 |
| 15,8 | 27,25 | 28,61 | 29,31 | 20,81 | 26,53 | 0,72 | 0,32 | |

Pasient 014

| RETIKULOCYTTER | | Cp-verdier | | | | | Relativ ekspresjon | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------|------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Dager etter tx: | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> | <i>ALAS</i> | <i>β2M</i> | <i>G6PDH</i> | <i>IMPDH I</i> | <i>IMPDH II</i> |
| Kalibrator | - | 31,77 | 32,22 | 33,91 | 24,40 | 31,71 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 33,84 | 33,71 | 33,79 | 25,08 | 30,47 | 0,20 | 0,31 |
| | -1,0 | 32,77 | 33,75 | 33,22 | 24,71 | 29,77 | 0,29 | 0,21 |
| | 0,8 | 29,32 | 32,03 | 31,27 | 22,74 | 27,93 | 0,88 | 0,18 |
| | 1,8 | 31,86 | 33,09 | 33,31 | 24,76 | 29,94 | 0,60 | 0,35 |
| | 8,8 | 32,11 | 33,32 | 33,55 | 24,35 | 29,44 | 0,43 | 0,26 |
| | 11,8 | 33,17 | 34,09 | 34,17 | 24,87 | 30,01 | 0,30 | 0,23 |
| | 13,8 | 31,37 | 30,92 | 32,30 | 23,66 | 29,08 | 0,42 | 0,77 |
| | 15,8 | 33,05 | 32,68 | 33,83 | 24,56 | 29,88 | 0,27 | 0,49 |
| | 18,8 | 30,62 | 30,01 | 31,63 | 23,11 | 28,85 | 0,51 | 1,03 |
| FULLBLODCELLER | | | | | | | | |
| Kalibrator | - | 31,94 | 32,04 | 33,05 | 24,21 | 31,89 | 1,00 | 1,00 |
| Prøver | -1,3 | 26,81 | 27,22 | 28,19 | 19,39 | 25,99 | 1,01 | 0,74 |
| | -1,0 | 27,47 | 28,81 | 29,21 | 19,75 | 26,57 | 1,00 | 0,39 |
| | 0,8 | 26,39 | 28,35 | 28,28 | 19,40 | 25,73 | 1,30 | 0,33 |
| | 1,8 | 26,19 | 28,15 | 28,23 | 19,15 | 25,63 | 1,37 | 0,34 |
| | 8,8 | 25,95 | 27,65 | 27,37 | 19,02 | 24,83 | 1,07 | 0,32 |
| | 11,8 | 26,66 | 28,11 | 27,97 | 19,18 | 25,81 | 0,98 | 0,35 |
| | 13,8 | 27,46 | 27,92 | 28,06 | 19,25 | 26,39 | 0,65 | 0,47 |
| | 15,8 | 27,30 | 27,57 | 28,00 | 19,51 | 25,99 | 0,70 | 0,57 |
| | 18,8 | 27,52 | 27,79 | 28,28 | 19,99 | 26,17 | 0,75 | 0,61 |