



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SİTOKROM P450 2D6 GENİ
RS3892097 POLİMORFİZMİ İÇİN
GENOTİPİK ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Gulibahaer REJIEPU

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİTOKROM P450 2D6 GENİ
RS3892097 POLİMORFİZMİ İÇİN
GENOTİPİK ANALİZ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Gulibahaer REJIEPU

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Sitokrom P450 2D6 Geni RS3892097 Polimorfizmi İçin Genotipik Analiz Yöntemi Geliştirilmesi." başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Gulibahaer REJIEPU
28.08.2019



KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Gulibahaer REJIEPU tarafından hazırlanan

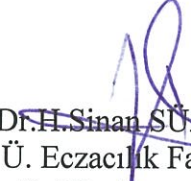
“Sitokrom P450 2D6 Geni rs3892097 Polimorfizmi İçin Genotipik Analiz Yöntemi

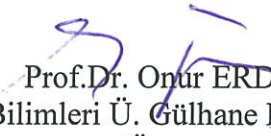
Geliştirilmesi.” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak

OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

27.08.2019


Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Onur ERDEM
Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane Eczacılık Fakültesi
Üye


Doç. Dr. Dilek AKYÜZLÜ
Ankara Ü. Adli Bilimler Enstitüsü
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	II
Kabul ve Onay	III
İçindekiler	IV
Önsöz	VII
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
Şekiller	X
Çizelgeler	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Sitokrom P450'in Kısaca Tanımı	2
1.2. İnsan CYP2D6	4
1.2.1. CYP2D6'nın Genel Özellikleri	4
1.2.2. CYP2D6 Substratları	8
1.2.3. CYP2D6 İnhibitörleri	13
1.2.4. CYP2D6 İndükleyicileri	16
1.2.5. CYP2D6 Fenotipleme	16
1.2.6. CYP2D6 Genotipik Analizi	20
1.2.7. CYP2D6 Genetik Polimorfizmi	21
1.2.7.1. CYP2D6 Alelleri ve Enzim Aktivitesine Etkileri	23
1.2.7.2. CYP2D6 Polimorfizmlerinin Popülasyon Frekansları	26
1.2.7.3. CYP2D6 Polimorfizmlerinin Klinik Önemi	29
1.3. CYP2D6*4 Alleli / 1846G> A (rs3892097)	30
1.4. Tek Nükleotid Polimorfizm Analizleri İçin Genotipik Analiz Yöntemleri	38
1.4.1. Alele Özgü Hibridizasyon	40
1.4.2. Alel-Spesifik Ligasyonu	41
1.4.3. Alel Spesifik Tek-Bazlı Primer Uzatma	42
1.4.4. Alel-Spesifik Enzimatik Kesim	42
1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (PZR-RPUP) Analizi	43
1.5.1. Primerler Tasarımı ve RPUP Enzimlerinin Tanımlanması	45
1.5.2. Amplikonların Kesilmesi	46

1.5.3. Elektroforetik Ayırma ve Parçaların Görselleştirilmesi	47
1.5.4. Tezin Amacı	48
2. GEREÇ VE YÖNTEM	49
2.1. Kullanılan Maddeler	49
2.2. Kullanılan Cihazlar	49
2.3. DNA Safılık ve Miktar Tayini	50
2.4. Deney Kurgusu	51
2.5. PZR ve RPUP Optimizasyon Çalışmaları	51
3. BULGULAR	55
3.1. CYP2D6 Geni *4 Aleli İçin Genotipik Analiz Yönteminin Kurulması	55
3.2. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile Çoğaltılması	
Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları	55
3.2.1. Primerler Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu	55
3.2.2. Magnezyum Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu	56
3.2.3. Deoksitribozün Trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP)	
Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu	57
3.2.4. İnsan Genomik DNA Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu	58
3.2.5. <i>Taq</i> DNA Polimeraz Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu	59
3.2.6. PZR Döngü Sayısı Optimizasyon Sonucu	60
3.2.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RPUP) Analiz Optimizasyon Sonucu	61
3.3. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile Çoğaltılmasında	
PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları	62
3.3.1. Denatürasyon Sıcaklığı	62
3.3.2. Denatürasyon Sıcaklık Süreleri	62
3.3.3. Primer Bağlanma Sıcaklığı	62
3.3.4. Primer Bağlanma Süresi	62
3.3.5. Sentez Süresi	63
3.4. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile PZR Ürünlerinin Jel	
Elektroforezinde Belirlenmesine Yönelik Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları	63
3.4.1. Agaroz Tipinin Seçimi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi	63
3.4.2. PZR Ürün Miktarı	63
3.4.3. Volt, Amper ve Sürenin Belirlenmesi	63

3.5. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile PZR Ürünlerinin RPUP Analizine Ait Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları	64
3.5.1. Restriksiyon Enzim Konsantrasyonu	64
3.5.2. Reaksiyon Hacmi	64
3.5.3. İnkübasyon Süresi	64
3.6. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile RPUP Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi Analizine Ait Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları	65
3.6.1. RPUP Ürün Miktarı	65
3.6.2. Agaroz Tipinin Seçimi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi	65
3.6.3. Volt, Amper ve Sürenin Belirlenmesi	65
4. TARTIŞMA	68
4.1. CYP2D6 Geni *4 Aleli İçin Genotipik Analiz Metodunun Değerlendirilmesi	68
4.1.1. Primerler	68
4.1.2. Magnezyum	69
4.1.3. Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)	69
4.1.4. DNA and <i>Taq</i> Polimeraz	70
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
ÖZET	74
SUMMARY	75
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	104

ÖNSÖZ

Bu çalışmada antipsikotik ve antidepresan tedavisi alan bazı hastalarda intihar riski bulunduğu ve bu riski önlemek için, bu türlü ilaçların metabolizmasında yaygın olarak yer alan CYP2D6 genindeki farklılığın aydınlatılmasını sağlayacak bir genotipik analiz yönteminin kurulması sağlanmıştır.

Yüksek lisans programımın tez aşamasında bana her zaman yardım eden, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde rehber olan, fikir veren ve bu esnada bana bilgi ve ilgisini esirgemeyen, beni her konuda destekleyen ve yetiştiren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Sinan SÜZEN'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında her zaman yardımlarını gördüğüm Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü doktora öğrencisi Fezile Özdemir, Uzman biyolog Ayşe KARAKUŞ'a teşekkür etmek isterim.

Bana Türkiye'de, yüksek lisans eğitimi için burs desteği sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı (YTB)'na da teşekkür ederim.

Türkiye Cumhuriyeti'ne ve Halkına, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Ankara Üniversitesi Türkçe ve Yabancı Dil Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÖMER) çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatıma hep önem ve destek veren, akademik çalışmalarım için beni sürekli teşvik eden babam REJIEPU KEREMU'ya annem RUZEHAN ABUDULI'ya ve kardeşlerim MANZEREMU REJIEPU ile ALIYA REJIEPU'ya sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	Alkol Dehidrojenaz
ADR	Advers İlaç Reaksiyonları
ALDH	Aldehid Dehidrojenaz
APOE	Apolipoprotein E
ASO	Alel Spesifik Oligonükleotid
AUCs	Konsantrasyon-Zaman Eğrilikleri
CYP450	Sitokrom p450
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DPD	Dihidropirimidin Dehidrojenaz
EC	Enzim Komisyonu Numarası
Et2Br	Etidyum Bromür
GABA	Gamma-Aminobütirik Asit
GBA	Genetik Bit Analiz
HLA	İnsan Lökosit Antijeni Alelleri
MAO	Monoamin Oksidaz
MDMA	3,4-Metilendioksi-N-Metilamfetamin
MDME	Mikrozomal İlaç Eetabolize Edici Enzim
MO	Metabolit Oranı
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NM	Normal Metabolizör
OM	Orta Metabolizör
PIRA	Primer Giriş Restriksiyon Analizi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCAT	Yuvarlanma Çember Büyütme Teknolojisi
RPUP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SERM	Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
SSRI	Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri
STS	Substrat Tanıma Siteleri

TSA	Trisiklik Antidepresan
UM	Ultra Hızlı Metabolizör
UV	Ultraviyole
ZM	Zayıf Metabolizör



ŞEKİLLER

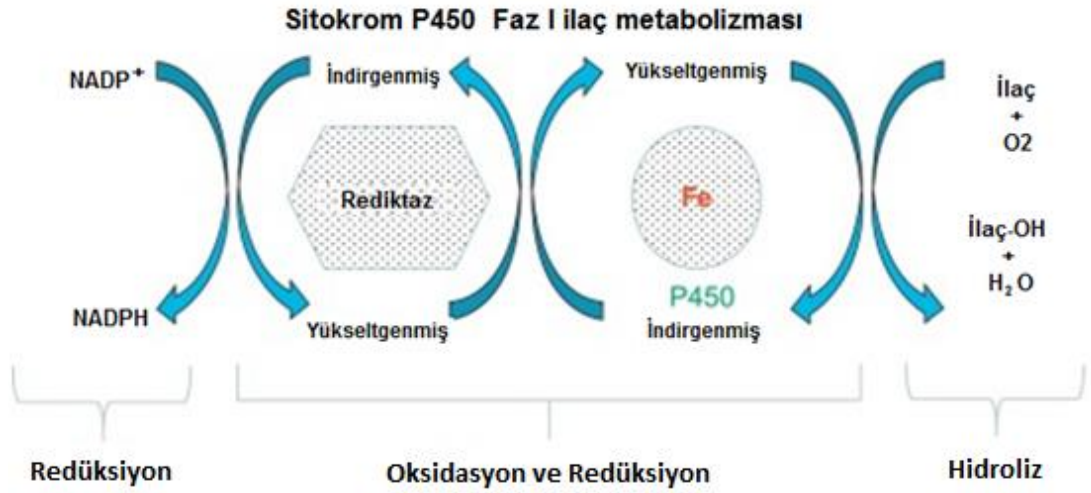
Şekil 1.1. Faz I ilaç metabolizmasının üç kategorisi: oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz	1
Şekil 1.2. Faz I ilaç-metabolize edici enzimler	3
Şekil 1.3. İnsan CYP2D gen kümesi ve CYP2D6'nın genel TNPLeri	5
Şekil 1.4. Rastgele bir Avrupa nüfusunda fenotip tanımı ve dağılımı	18
Şekil 1.5. Sitokrom P450 (CYP) 2D6 lokusunun polimorfizmi	23
Şekil 1.6. Fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan CYP2D6 allellerinin yapısı	25
Şekil 1.7. Sitokrom P450 enzim nomenklatürünün bir örneği olarak CYP2D6 * 4'ün isimlendirmesi	31
Şekil 1.8. CYP2D6 geninin intron 3'teki G1934A polimorfizmi	32
Şekil 1.9. Alel tanımlama yöntemlerinin prensipleri	41
Şekil 3.1. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, primer konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi	56
Şekil 3.2. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, magnezyum konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi	57
Şekil 3.3. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, dNTP konsantrasyonunun, PZR ürünü üzerine olan etkisi	58
Şekil 3.4. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, genomik DNA konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi	59
Şekil 3.5. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, <i>Taq</i> DNA polimeraz konsantrasyonunun PZR ürünü üzerine olan etkisi	60
Şekil 3.6. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında reaksiyon döngü sayısının PZR ürünü üzerine olan etkisi	61
Şekil 3.7. CYP2D6 geni*4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR-RPUP genotipik yöntemi ile analizin agaroz jel elektroforezdeki Görüntüsü	61

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. CYP2D6 tarafından metabolize edilen birçok farklı terapötik sınıfın substratları	12
Çizelge 1.2. CYP2D6 inhibitörlerinin listesi	15
Çizelge 1.3. Terimlerin tanımları	22
Çizelge 1.4. Popülasyonlardaki CYP2D6 alel frekansları	28
Çizelge 1.5. PZR-RPUP 'nin tasarımı için programlar	46
Çizelge 2.1. CYP2D6*4 geni için PZR reaksiyon konsantrasyonları (A), PZRProgramı (B), RPUP koşulları (C)	66

1. GİRİŞ

İlaç ya da ksenobiyotik metabolizması, lipofilik kimyasal bileşiklerin hidrofilyan ürünlere dönüştürülmesi, böylelikle böbrek yoluyla vücudun dışına atılabilmesi için gerekli olan enzimatik bir süreçtir. Metabolizma hızı, ilaçların farmakolojik etkisinin süresini ve yoğunluğunu belirler. Bu reaksiyonlar toksik bileşiklerin detoksifikasyonu için de gereklidir. İlaç metabolizması başlıca üç fazda incelenir. Faz I reaksiyonlarında, çeşitli enzimler, ksenobiyotiklere bir reaktif veya polar grup ilave etmek üzere hareket eder. Sitokrom p450 (CYP450) enzimleri, Faz I metabolizmasından sorumlu olan başlıca proteinlerdir. Faz II reaksiyonlarında, bu dönüştürülmüş bileşikler ayrıca çeşitli bileşiklerle konjuge edilir. Son olarak Faz III'te konjüge ksenobiyotikler taşıyıcılar tarafından atılmaktadır. CYP450 ile katalize edilen Faz I oksidatif reaksiyonlar arasında hidroksilasyon, epoksidasyon, dealkilasyon, deaminasyon ve dehalojenasyon bulunmaktadır (Şekil 1.1) (Mittal ve ark., 2015).



Şekil 1.1. Faz I İlaç Metabolizmasının Üç Kategorisi: Oksidasyon, Redüksiyon ve Hidroliz.

İlaç metabolizması veya biyotransformasyon çalışması, vücuttaki ilaçların ne kadar sürede kaldıklarını, dozaj rejimlerinin yapılandırılmasını, ilaç metabolitlerinin farmakolojisi ve toksikolojisini ve çeşitli ilaç kombinasyonlarının etkileşimlerini anlamak için hayati önem taşır. Hidrofobisite çoğu ilaç molekülünün önemli bir kimyasal özelliğidir, çünkü hidrofobiklik arttıkça iyi oral emilim ve moleküler

hedeflerle etkileşim olasılıkları artmaktadır. Hidrofobik ilaç moleküllerinin daha hidrofilik moleküllere metabolizması veya biyotransformasyonu, ilaçların vücuttan atılmasında çok önemli bir faktördür (Bachmann, 2009). Metabolizmanın yetersiz olması ilaçların vücuttan zamanında atılmamasına sebep olur, böylece birikim ve toksisiteye meydana gelir ve ciddi yan etkiler ve ölüm oluşabilir. Bu durum sadece klinik vakalarda değil aynı zamanda bazı adli vakalarda da büyük önem taşımaktadır.

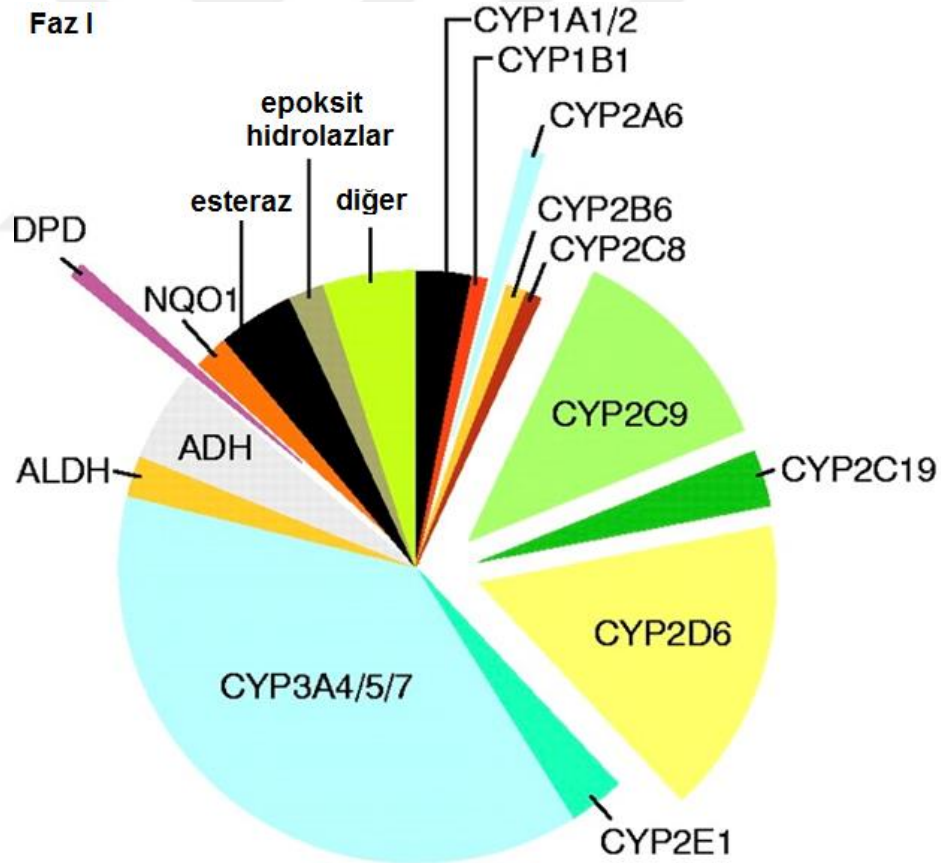
1.1. Sitokrom P450'in Kısaca Tanımı

İlaçları ve diğer ksenobiyotikleri metabolize etme ve detoksifikasyon kapasitesinde bireylerarası büyük farklılıklar vardır. Bunlar genetik, epigenetik, çevresel ve patofizyolojik kaynaklıdır. İlaçların metabolize edilememesinden kaynaklı advers ilaç reaksiyonları (ADR'ler) hafif ve geri dönüşümlü yan etkilerden ciddi yan etkilere kadar değişen skalada ilaç kullanıcılarına zarar verebilir. Hatta, ADR'ler dünya genelinde meydana gelen ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olmaktadır ve ABD'de ADR'ye bağlı ölümler beşinci sırada olup yılda 100.000 ölüme kadar ulaşabilmektedir. Buna ek olarak, ADR'ler ayrıca hastaneye yatışların% 7'sinden sorumludur (Eichelbaum ve ark., 2006); yaşlı nüfusta% 30'a kadar yükselmektedir (> 70 yaş) (Paul ve ark., 2008). Bu ADR'lerin büyük bir kısmı, ana ilacın metabolik aktivasyonuna bağlı oluşan reaktif ürünlere ile veya doğuştan gelen bağışıklık sistemini içeren immün aracılı toksisite sonucunda oluşmaktadır. (Alfirevic ve Pirmohamed, 2010). ADR'ler başlıca kalp fonksiyonlarını etkiler veya karaciğer toksisitesine neden olur. Ayrıca, ADR'lerden dolayı piyasadan çekilen ilaçların büyük bir kısmı kardiyotoksisite veya hepatotoksisite ile ilişkilidir. (Need ve ark., 2005).

İlaçların metabolize edilmesi, diyet bileşenlerinin normal metabolizması için kullanılan aynı enzimatik yolları ve taşıma sistemlerini içeren doğal bir işlemdir. Bunlara ksenobiyotik metabolize edici enzimler denir. Lipofilik olan ilaçlar, vücuttan atılmak için suda çözünür bileşiklere dönüştürülmelidir, yoksa birikime ve toksisiteye yol açabilirler. Bu süreç, üç Faz içeren kimyasal reaksiyonlar yoluyla gerçekleşir; Faz 1, Faz 2 ve Faz 3. Bu reaksiyonlar için enzimler, vücudun birçok dokusunda bulunur ve gastrointestinal sistemde (karaciğer, küçük ve kalın

bağırsaklarda) en yüksek seviyededir. Diğer organlar ise böbrek, göğüs, beyin ve akciğerlerdir. Hücre içi membranlar ve hücrelerin sitozolü de bu enzimleri içerir. Bu enzimler pigmentlerdir (sitokromlar) çünkü bunlar heme içerirler ve hayvanlar, bitkiler, mantarlar, protistler, bakteriler ve arkeadan virüse kadar prokaryotik ve ökaryotik dünyadaki tüm organizmalarda bulunurlar. Sitokrom P450'nin ilaç metabolize etme işlevinde benzersiz olan farklı sitokrom türleri mevcuttur (Preissner ve ark., 2013).

Sitokrom P450 (CYP, EC1.14.14.1) süper ailesi, birçok endojen madde (örneğin eikosanoitler ve steroidler) ve ksenobiyotikler (örneğin terapötik ilaçlar ve çevresel bileşikler) daha hidrofilik bileşiklere oksitleyen en önemli Faz I ilaç metabolize eden (edici) enzimleri temsil etmektedir (Nebert ve Russell, 2002). Faz I ilaç-metabolize edici enzimler Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Faz I ilaç-metabolize edici enzimler. CYP: sitokrom P450, NQO1: NADPH: kuinon1; oksidoredüktaz (DT diyaforaz); DPD: dihidropirimidin dehidrojenaz; ADH: alkol dehidrojenaz; ALDH: aldehid dehidrojenaz (Evans ve Relling, 1999).

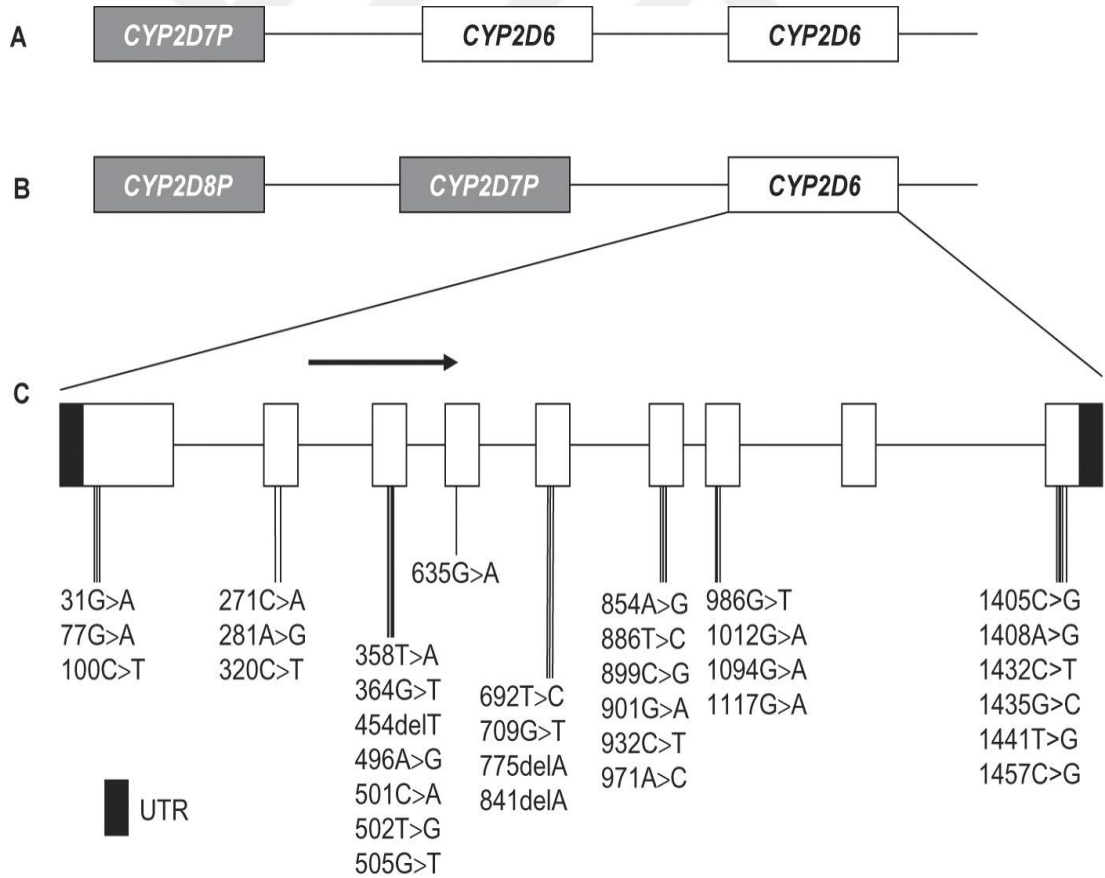
İnsan organizmasında bilinen sekiz P450 aileden dördü, yani, 1, 2, 3 ve 4 aileleri ilaç metabolizmasına katılmaktadır. Detoksifikasyon için en önemli enzimlerden biri olan birçok P450 enzimi başlıca karaciğerde eksprese edilir (Nebert ve Gonzalez, 1987; Matsunaga ve ark., 1988). Sitokrom P450ler oldukça farklı regülasyon düzenlerine sahiptir. P450 genlerinden bazıları düşük seviyelerde karaciğer ekspresyonuyla karakterizedir, ancak, spesifik ilaçlar ve kimyasal kanserojenler tarafından birkaç kat arttırılabilirler (Nebert ve Jones, 1989). Çoğu CYP'ler inhibisyona ve indüksiyona tabidir ve genetik mutasyonlar birçok CYP'nin enzim aktivite farklılığında önemli bir rol oynamaktadır, özellikle CYP2A6, 2C9, 2C19 ve 2D6 başlıca izoenzimlerdir (Ingelman-Sundberg ve ark., 2007). CYP'ler içindeki genetik polimorfizmler öncelikle bu belirli enzimler için substrat olarak işlev gören ilaçların metabolizmasını etkiler ve advers ilaç etkilerinin riskini değiştirmenin yanı sıra ilaç yanıtında farklılıklara yol açabilirler. CYP ailelerinin çoğunun üyeleri polimorfiktir ve protein ekspresyonunun veya aktivitesinin değişimi ile sonuçlanan allelik varyantlar, ilaçların metabolizmasında önemli etkilere sahiptir (Ingelman-Sundberg ve ark., 2007; Kirchheiner ve Seeringer, 2007; Tomalik-Scharte ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2009). Farklı hasta gruplarındaki enzimatik aktivite ve P450 regülasyonu, birçok ilacın farmakolojik aktivitesindeki farklılıkları meydana getirir ve genellikle oldukça yararlı bir ilacın yan etkilerine neden olabilir. Debrizokin, bufuralol ve spartein de dahil olmak üzere çeşitli ilaçların metabolizmasından sorumlu olan P450 2D6, ilaç metabolize eden sitokrom P450 polimorfizm için iyi bir örnek olarak bilinmektedir (Gough ve ark., 1990).

1.2. İnsan CYP2D6

1.2.1. CYP2D6'nın Genel Özellikleri

CYP2D6 geni, 22q13.1 kromozomunda yer almaktadır ve 497 amino asidi kodlayan 1.491 bp açık okuma çerçevesine sahip dokuz ekzondan oluşmaktadır. (Eichelbaum ve ark., 1987; Heim ve Meyer, 1990; Kimura ve ark., 1989). CYP2D6, oldukça homolog inaktif psödojen CYP2D7P ve CYP2D8P'nin bir gen kümesine

aittir (Şekil 1.3) (Heim ve Meyer, 1992; Kimura ve ark., 1989; Steen ve ark., 1995). CYP2D8P ekzonlarında birden fazla silme ve eklemeyi kapsarken, CYP2D7P, ekzon 1'de bir T-ekleme içerir ve okuma çerçevesinin bozulmasına neden olur. CYP2D7P, CYP2D6'ya CYP2D8P'den daha çok benzemektedir. Kodlama dizisi, sadece bir inaktivasyon mutasyonunu, birinci ekzonda T226'nın eklenmesi, göstermektedir (Kimura ve ark., 1989). İnsan CYP2D lokusunun gelişimi, üç genin, iki inaktivasyonun (CYP2D7P ve CYP2D8P) ve bir kısmen inaktivasyonunun (CYP2D6) ortadan kaldırılması ile ilişkilidir (Ingelman-Sundberg, 2005; Heim ve Meyer, 1992). Fonksiyonel olmayan bir CYP2D7P geninin ve bir CYP2D8P psödojeninin tanımlanması ve karakterize edilmesine dayanarak, Kimura ve ark., gen duplikasyon olaylarının CYP2D6 ve CYP2D7P'yi oluşturduğunu ve CYP2D8P'yi oluşturmak için gen dönüşüm olaylarının daha sonra meydana geldiğini önerdiler (Kimura ve ark., 1989).



Şekil 1.3. İnsan CYP2D gen kümesi ve CYP2D6'nın genel TNPleri. (A) CYP2D6 duplikasyonu (kopyalama) veya çokluluk (çoğaltma) (tandem kopya N = 2-12); (B) CYP2D loküsü; ve (C) CYP2D6 geninde saptanan genel TNP'ler. Tüm CYP2D6 geni silinebilir.

CYP2D6, enzimlerin süper ailesi sitokrom P450'in bir üyesidir. CYP2D6, ağırlıklı olarak opioid analjezikleri, çeşitli psikotrop ilaçlar gibi merkezi sinir sisteminde (MSS) rol alan birçok ilacın, endojen bileşiklerin ve reaktif ara maddelerin (Masimirembwa ve Hasler, 1997; Cupp ve Tracy, 1998; Ingelman-Sundberg ve ark., 1999a; Gardiner ve Begg, 2006; Kosarac ve ark., 2009; Stamer ve ark., 2010) biyotransformasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Crisafulli ve ark., 2011; Zanger ve Schwab, 2013; Zanger ve ark., 2008). Bugüne kadar, CYP2D6, polimorfizm ile ilişkili olarak en yoğun şekilde araştırılan CYP'lerden biridir ve tüm hepatik CYP'lerin yalnızca küçük bir kısmını (~% 2-4) kapsamaktadır. Ancak, insan karaciğerinde şu anda kullanılan ilaçların% 25'ini metabolize etmektedir (Ingelman-Sundberg ve ark., 2007; Cascorbi, 2003; Gardiner, 2006; Zhou ve ark., 2008). CYP2D6 için tipik substratlar büyük oranda lipofilik bazlardır ve bazı antidepresanlar, antipsikotikler, antiaritmikler, antiemetikler, b-adrenoseptör antagonistleri (b-blokerleri) ve opioidler de bu grupta yer almaktadır (Marechal ve ark., 2008).

CYP2D6, hem de sitokrom P450'nin diğer izoformları, esasen hepatosit endoplazmik retikulumda lokalizedir. Muratori ve ark., CYP2D6'nın hepatosit plazma membranı üzerinde de bulunduğu inandırıcı kanıtlar sağlamıştır. CYP2D6, bağırsak, böbrek, akciğer, deri ve beyin dahil ekstrahepatik dokularda da eksprese edilir (Muratorive ark., 2000). Siegle ve ark., insan beyninin bazı bölgelerinde CYP2D6 ekspresyonu hakkında açık kanıt sağlamıştır (Siegle ve ark., 2001). Zhu ve ark., CYP2D6'nın bağışıklık hücrelerinde (insan beyaz kan hücreleri) de bulunduğunu göstermiştir (Zhu ve ark., 2005). CYP2D6 aktivitesi, bir popülasyonda ve etnik olarak farklı popülasyonlar arasında geniş ölçüde değişir. Hızlı enzim aktivitesine sahip olanlar, ultra hızlı metabolizörler (UM'ler) olarak sınıflandırılır. Bu grup metabolize ediciler normal ilaçları son derece çabuk metabolize ettiği için ilacın hızlı atılımından dolayı tedavide başarısızlık riski taşırlar. Tersine, zayıf metabolizörler (ZM'ler), kayda değer CYP2D6 aktivitesine sahip olmadıklarından doz bağımlı advers ilaç olayları riski altındalardır. Özellikle opioidlerde, farklı opioidler arasında klinisyenler tarafından sıkça kullanılan standart eşdeğerlik dozları ve ilgili dönüştürme faktörlerinin uygulanması, ZM ve UM hastalar için uygun olmayabilir ve ciddi klinik sonuçlar doğurabilir (Ingelman-Sundberg, 2005;

Ingelman- Sundberg ve Rodriguez-Antona, 2005; Ingelman- Sundberg ve Sim, 2010; Ingelman-Sundberg ve ark., 2007; Llerena ve ark., 2009; Zanger ve Schwab, 2013).

CYP2D6, substratları için yüksek afinite ve düşük kapasiteye sahip gibi görünür ve nispeten düşük konsantrasyonlarda doymuş hale gelir. Bu enzimin birincil hepatik ekspresyonu, oral ilaç uygulamasından sonra ilk geçiş metabolizmasını yönetirken, bağırsak ekspresyonunun düşük seviyesi önemli görünmemektedir. Diğer CYP'lerin aksine, CYP2D6 birçok bilinen çevresel etken tarafından genellikle etkilenmez ve steroidler gibi yaygın olarak bilinen enzim indükleyiciler tarafından indüklenebilir değildir (Bock ve ark., 1994). CYP2D6 enzimi tarafından metabolize edilen ilaçlara, bu enzimin substratları denir. Artan CYP2D6 enzim aktivitesi, daha hızlı metabolizma ve beklenenden daha kısa yarılanma ömrü ile sonuçlanıp zamanla potansiyel farmakolojik etki kaybına neden olabilir. Buna karşılık, CYP2D6 enzim inhibisyonu meydana gelebilir, bu da enzim tarafından metabolize edilen bir ilacın plazma konsantrasyonunda önemli bir artışa neden olur. Sonuç olarak, standart doz rejimlerinde artmış yan etki veya toksisite olasılığı ortaya çıkabilir (Gardiner ve Begg, 2006). Substratların CYP2D6 polimorfizmlerinden etkilenmesi beklenir ve inhibitörlerin birlikte reçete edilmesi durumunda CYP2D6'nın diğer substratlarını etkilemesi beklenir. CYP2D6 da endojen morfin sentez yolağına katılır. Bu nedenle, CYP2D6 aktivitesindeki değişiklikler bir hastanın ağrı düzeyini etkileyebilir ve bireysel opioid yanıtında değişikliğe katkıda bulunabilir (Jannetto ve Bratanow, 2010; Kasai ve ark., 2008; Kosarac ve ark., 2009; Lotsch ve Geisslinger, 2006; Lotsch ve ark., 2004; Rollason ve ark., 2008). Şiddetli toksisite riski taşıyan veya belirli bir tedaviden fayda sağlayabilecek hastalar prospektif olarak tanımlanabilirse, tedavi maliyeti düşebilir ve tedavi başarısı daha hızlı ve daha kesin bir şekilde artabilir. Bu nedenle, CYP2D6 genindeki varyasyonu aydınlatmak için genotipik bir yöntem oluşturmak, ZM'lerde sahip oldukları genetik farklılıklardan dolayı ortaya çıkabilecek zararlı etkileri önlemeye yardımcı olabilir. Ek olarak, bu gen birçok antipsikotik ve antidepresan ilacın metabolizmasında yer aldığından ve bu tedaviyi alan bazı kişilerde intihar riski bulunduğundan genetik farklılığın ortaya çıkarılması adli toksikoloji açısından önem taşımaktadır. Bazı adli vakalarda ilacın metabolitine oranının belirlenmesi, vakanın aydınlatılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Beklenmedik bir oranın oluşmasında

genetik farklılığında katkısı olmaktadır. Aşağıdaki vaka adli toksikoloji açısından iyi bir örnek olabilir.

En az 0.2 mg / L amitriptilin konsantrasyonunun tespit edildiği 202 ölüm sonrası bir serisinde, Koski ve ark., hidroksillenmiş inaktif metabolitler oranı ile CYP2D6'nın işlevsel kopyaları sayısı arasında pozitif korelasyonlar bulmuşlar, ancak normal amitriptilin tedavisinin (dolayısıyla intihar girişimleri hariç tutuluyor) ve CYP2D6 ZM durumunun bir kombinasyonundan dolayı meydana gelen herhangi bir ölümcül zehirlenme bulunamamıştır. İlginç bir şekilde, 60 mg / L'lik son derece yüksek bir amitriptilin konsantrasyonu, 56 yaşındaki CYP2D6*4 / *4 genotipine (ZM) sahip olan bir kadında tespit edilmiştir, kadın kocasının ilacını büyük miktarda yuttuktan sonra mutfakta ölü olarak bulunmuştur (Koski ve ark., 2006).

1.2.2. CYP2D6 Substratları

CYP, sitokrom P450 süper ailesinin kısaltmasıdır, 2 aileyi, D alt aileyi ve 6 üye sayısını temsil etmektedir. CYP başka şekillerde de temsil edilir, örneğin, -CYD6, CYP2D, CYP2D7AP, CYP2D7BP, CYP2D7P2, CYP2DL1, CYP11D6, P450C2D, P450DB1, CYP2D8P2 ve P450-DB1. Bu enzim için diğer isimler mikrozomal monooksijenaz, ksenobiyotik monooksijenaz, debrizokin 4-hidroksilaz olarak geçmektedir. P450, çok sayıda yapısal olarak çeşitlilik gösteren endojen ve ekzojen bileşiklerin geniş bir substrat özgüllüğü ve genellikle bölgesel ve stereoselektiflik açısından metabolize olmasını sağlar. CYP2D6'nın substratları genellikle düzlemsel bir hidrofobik aromatik halka ve fizyolojik pH'da protonlanabilen ve molekülün düzlemsel kısmının üzerinde negatif bir moleküler elektrostatik potansiyele sahip olabilen bir azot atomuna sahip lipofilik bazlardır. Azot atomu, CYP2D6'nın aktif sahasındaki amino asitlerin karboksilat grubu ile elektrostatik etkileşimler için gerekli olduğu düşünülmektedir (Ito ve ark., 2008). Hidroksilasyon reaksiyonu azot atomundan 5 veya 7Å uzaklıkta gerçekleşir. Bölgeye yönelik mutajenite deneyleri, Asp301'in, substrat azotuna bağlanmaya neden olan negatif yüklü amino asit olduğunu ortaya koymaktadır (Zanger ve ark., 2004). P450'de, substrat bağlayıcı kalıntılarında belirgin farklılıklar gösteren altı Substrat Tanıma Siteleri (STS) mevcuttur (Ito ve ark., 2008).

CYP2D6, kardiyovasküler ve merkezi sinir sistemini hedef alan bazı ilaçları metabolize edebilir ve bunların arasında terapötik endeksi darp birçok ilaç bulunmaktadır. CYP2D6 tarafından yaygın olarak metabolize edilen ilaçlar arasında, trisiklik antidepresanlar (örn., klomipramin, imipramin, doksepin, desipramin ve nortriptilin), selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar) (örn., fluoksetin, fluvoksamin ve paroksetin), diğer nontrisiklik antidepresanlar (örneğin atomoksetin, maprotilin, mianserin ve venlafaksin), nöroleptikler (örneğin kloropromazin, perfenazin, tioridazin, zotepin, zuklopentiksol, mianserin, olanzapin, risperidon, sertindol ve haloperidol) ve beta-blokerler (örneğin atenolol, bufuralol, karvedilol, metoprolol, bisoprolol, propranolol, bunitrolol, bupranolol, timolol ve alprenol) bulunmaktadır (Gardiner ve Begg, 2006; Ingelman-Sundberg, 2005).

CYP2D6 aynı zamanda opioidlerin (örn., kodein, dihidrokodein ve tramadol), antiemetik maddelerin (örn., tropisetron, ondansetron, dolasetron ve metoklopramid), antihistaminlerin (örn., terfenadin (Jones ve ark., 1998), oksatomid (Goto ve ark., 2004), astemizol (Matsumoto ve Yamazoe, 2001), epinastin (Kishimoto ve ark., 1997), prometazin (Nakamura ve ark., 1996), loratadin (Yumibe ve ark., 1995) mequitazine (Nakamura ve ark., 1998), azelastin, diphenhidramin ve klorfeniramin ve antiaritmiklerin (örneğin, spartein, propafenon, encainid, flekainid, sibenzolin, aprindin, lidokain, prokainamid ve meksiletin) metabolizmasında da görev yapar (Imai ve ark., 1999; Nakajima ve ark., 1999).

Sparteın ve debrizokin, CYP2D6'nın iki prototipik substratıdır, CYP2D6 aracılı metabolizmanın fenotipini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zanger ve ark., 2004). Yapılan ilk çalışmalarda, Sparteinin öncelikle CYP2D6 tarafından N1 oksidasyonu yoluyla bir N-okside metabolize edildiği bulunmuştur (Eichelbaum ve ark., 1975). N-oksit, 2-dehidrospartin (yani, 2,3-didehidrospartin) ve 5-dehidrospartenin (yani, 5,6-didehidrospartin) su kaybıyla yeniden düzenlenir. Normal Metabolizörler (NM'ler) [metabolik oran = üriner spartein atılımı ÷ (üriner 2-dehidrospartein + üriner 5-dehidrospartein atılımı <2] ve ZM'lerden (metabolik oran > 20) insan karaciğer mikrozomlarındaki 2-dehidrospartin oluşumu, NM'ler ve ZM'ler arasındaki Michaelis-Menten sabitinde (Km) 32 kattan fazla fark (58.3'e karşı 1880mmol / L) göstermiştir (Osikowska-Evers ve ark., 1987). Debrizokin, antihipertansif bir ajan olarak kullanılmıştır ve 4-hidroksilasyona öncelikle CYP2D6

aracılık etmektedir (bu nedenle CYP2D6 debrizokin 4-hidroksilaz olarak da bilinir) (Woolhouse ve ark., 1979; Eiermann ve ark., 1998; Gonzalez ve ark., 1988). Debrizokin, esas olarak CYP2D6 tarafından üç metabolite metabolize olur: 4-hidroksideizosikin, 3-hidroksi-brizokin ve 1-hidroksi-brizokin (Eiermann ve ark., 1998).

Dekstrometorfan, narkotik analjeziklerin sentetik bir analogudur, ve antitussif bir etken olarak kullanılır. İnsanlarda, öncelikle değişmemiş ana ilaç ve farmakolojik olarak aktif olan dekstorfan olarak atılır. Dekstrometorfan'dan dekstorfanın oluşumuna esas olarak O-demetilasyon yoluyla CYP2D6 aracılık eder (Dayer ve ark., 1989; Jacqz-Aigrain ve ark., 1993) ve debrizokin-sparteini tipi oksidatif polimorfizmi ile birlikte gruplar oluşturur (Schmid ve ark., 1985). Dolayısıyla dekstrometorfan şu anda CYP2D6 aktivitesinin hem *in vivo* hem de *in vitro* belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bufuralol, bir beta-blokerdir, CYP2D6'nın *in vitro* çalışması için bir prob substratı olarak kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır (Zanger ve ark., 2004). Bufuralol üç metabolit, yani 1'-hidroksibufürol, 1'-oksobürolol ve 1' 2' -etenilbürolol'e metabolize edilir (Hiroi ve ark., 2002). Bufuralolün önemli bir metaboliti olan 1'-hidroksibufürol seviyesi genellikle CYP2D6 aktivitesi ve / veya seviyelerinin bir indeksi olarak ölçülür ve CYP2D6 ZM'lerinde bufuralolden oluşan 1' -hidroksifurfürol miktarının küçük olduğu bilinmektedir (Carcillo ve ark., 2003).

Tramadol, iki kiral merkeze sahip olan aminosiklo-heksanol türevi sentetik bir opioid analjeziktir, ve CYP2D6 için bir prob substrat olarak da kullanılır. (-) - Tramadol, (+) - tramadol gibi ağırlıklı CYP2D6 tarafından metabolit O-desmetiltramadol'a (M1) metabolize olur, fakat daha az oranda metabolize olur. İnsanlarda tramadol'un birincil metabolitleri M1 ve N-desmetil-tramadol'dur (M2). (Paar ve ark., 1997; Subrahmanyam ve ark., 2001).

Tamoksifen, CYP2D6 tarafından, N-demetilasyon ve 4-hidroksilasyon yoluyla farmakolojik olarak aktif metabolit olan endoksifene dönüşür (Dehal and Kupfer, 1997; Crewe ve ark., 2002; Beverage ve ark., 2007). Sinnarizin ve onun flor türevi flunarizin (her ikisi de seçici kalsiyum giriş antagonistleri) CYP2D6 büyük oranda tarafından metabolize edilir (Narimatsu ve ark., 1993). CYP2D6, birkaç

antihistaminin oksidasyonuna büyük katkıda bulunur. Tolterodin, yeni bir muskarinik reseptör antagonisti olup, esas olarak CYP2D6 tarafından metabolize edilir (Postlind ve ark., 1998). CYP2D6, pranidipinin de esterifikasyonu için temel enzimdir (Kudo ve ark., 1999).

CYP2D6, birçok anti-HIV ilaçlarının metabolizmasına yer almaktadır, örneğin ritonavir (Kumar ve ark., 1996), nevirapin (Erickson ve ark., 1999) ve delavirdin, ancak bu anti-HIV ilaçları esas olarak CYP3A4 tarafından metabolize edilmektedir. Taqrine (Spaldin ve ark., 1994), donepezil (Barner and Gray, 1998) ve galantamin (Bachus ve ark., 1999) gibi çeşitli kolinesteraz inhibitörleri, kısmen CYP2D6 tarafından metabolize edilir ve CYP3A4 ve 1A2'den önemli katkılar sağlar. Antialerjik ilaç oksatomid esas olarak CYP2D6 tarafından metabolize edilir ve CYP3A4'ünde katkısı olur (Goto ve ark., 2004). Antimalaryal ilaç halofantrin, CYP2D6'nın bir substratıdır (Halliday ve ark., 1995). Buna ek olarak, CYP2D6 zolpidem'den alkol oluşumuna katılır (Pichard ve ark., 1995). Çizelge 1.1, CYP2D6 tarafından metabolize edilen birçok farklı terapötik sınıfın substratlarının güncellenmiş bir listesini içermektedir.

Çizelge 1.1. CYP2D6 tarafından metabolize edilen birçok farklı terapötik sınıfın substratları. DEHB (dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu), MAO (monoamin oksidaz), MDMA (3,4-Metilendioksi-N-Metilamfetamin), MDME (mikrozomal ilaç metabolize edici enzim) (Zanger ve ark., 2004).

Terapötik sınıf	İlaç	CYP2D6 Tarafından Katalize Edilme Yolu
Analjezik / antitusifler	Kodein Dekstrometorfan Dihidrokodein Etilmorfin Hydrocodone Norkodein Oksikodon	O-demetilasyon O-demetilasyon O-demetilasyon O-deetilasyon N-demetilasyon O-demetilasyon O-demetilasyon
Anti-DEHB ilacı	Atomoksetin	Aromatik hidroksilasyon
Antiaritmikler	Aprindin Enkainid Flekainid Meksiletin N-propilajmalin Prokainamid Propafenon Sparteın	Aromatik hidroksilasyon O-demetilasyon O-dealkilasyon (?) Aromatik hidroksilasyon Benzilik hidroksilasyon Arilamin N-oksidasyonu Aromatik hidroksilasyon Alifatik hidroksilasyon
Antidemans ilaçları	Galantamin Nisergolin	O-demetilasyon N-demetilasyon
Trisiklik antidepresanlar	Amitriptilin Klomipramin Desipramin İmipramin Nortriptyline	Benzilik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Benzilik hidroksilasyon
Diğer antidepresanlar	Sitalopram Desmetilsitalopram Fluoksetin Fluvoksamin Maprotilin Mianserinin Minaprin Mirtazapin Paroksetin Venlafaksin	N-metilasyonu N-metilasyonu N-metilasyonu Belirsiz Belirsiz Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Demetilentiyum O-demetilasyon
Antidiyabetik	Fenformin	Aromatik hidroksilasyon
Anti-östrojen	Tamoksifen	Aromatik hidroksilasyon
Antihipertansifler	Debrizokin Guanoksan İndoramin	Benzilik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon
Antiemetikler	Dolasetron Ondansetron Tropisetron	Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon

Çizelge 1.1. (Devam)

Antihistaminikler	Mekuitazin Prometazin	Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon
Antipsikotikler	Haloperidol Perfenazin Risperidon Tiyoridazin Zuklopentiksol	N-dealkilasyon N-dealkilasyon Alifatik hidroksilasyon Sülfoksidasyon N-dealkilasyon
Iştah kesici	Deksfenfluramin	N-dealkilasyon
Beta adrenerjik bloke edici maddeler	Alprenolol Bufuralol Bunitrolol Bupranolol Karvedilol Metoprolol Propranolol Timolol	Aromatik hidroksilasyon Benzilik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon Alifatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon O-dealkilasyon
Kalsiyum antagonisti	Perheksilin	Alifatik hidroksilasyon
MAO inhibitörleri	Amiflamin Brofaromın	N-metil giderme O-demetilasyon
Rekreasyonel ilaçlar	Metoksimetamin MDMA, MDME	O-demetilasyon Demetilenasyonu
Vazodilatuarlar	Sinnarizin Flunarizin	Aromatik hidroksilasyon Aromatik hidroksilasyon

1.2.3. CYP2D6 İnhibitörleri

CYP2D6, çoğunlukla indüklebilir değildir, ilaç-ilaç etkileşimine yol açan birçok ilaç ve bileşik tarafından inhibisyona tabi tutulmaktadır. Strobl ve ark. 1993'te, inhibitör grubunun yapısal aktivite ilişkisini bulmak için CYP2D6'nın güçlü bir inhibitörü olan bir ajmalicine bileşimini kullanmıştır ve inhibitörlerde fizyolojik pH'da daha yüksek protonasyon derecesine sahip üçüncül bir protonu ve düz bir hidrofobik bölgeyi bulmuştur ve burada azot atomundan maksimum 7.5Å° mesafeye kadar uzanan N-H eksenine dikey bir düzlembulunmuştur (Strob ve ark., 1993). Alkil zincirinin uzatılması, bileşiklerin CYP2D6'ya olan afinitesini önemli ölçüde artırır. İlaç etkileşimleri hafif, normal veya ölümcül olabilir. Örneğin, CYP2D6 aracılı venlafaksin-propafenon etkileşimi, halüsinasyonlara ve psikomotor ajitasyona neden olabilir. Kuinidin, dekstrometorfanın CYP2D6 aracılı metabolik dönüşümünü

inhibe eder, bu nedenle psödobulbar etki için kullanıldığında sistemik biyoyararlılığı ve daha az ADR'yi artırır (Gurleyve ark., 2008).

CYP2D6, substrat olması gerekmeyen ancak yüksek afiniteli enzimebağlanan birçok bileşikler tarafından inhibe edilmeye yatkındır, örn. kinidin veya metadon (Gelston ve ark., 2012). Bu inhibitörlerden bazıları, hastanın fenotipini değiştirecek kadar güçlüdür ve bu fenomen fenokopi olarak bilinmektedir (Lewis ve ark., 2004). Kinidin, CYP2D6'nın en güçlü inhibitörüdür ($ki = 0.03$) (Smith ve Jones, 1992). Kinidin'in diastereoizomeri olan kininin, kinidin'den yüzlerce kez daha az potent inhibitördür. Bununla birlikte, kinidin CYP2D6'nın bir substratı değildir (Lennard, 1990). 200 mg kinidin sülfatın tek bir oral dozu, çoğu NM'leri ZM'lere dönüştürmek için yeterlidir (Muralidharan ve ark., 1991). Fluoksetin (Brosen ve Skjelbo, 1991; Brynne ve ark., 1999), paroksetin (Jeppesen ve ark., 1996) ve propofenon (Kroemer ve ark., 1989), düşük nanomolar aralıkta inhibisyon sabitiyle CYP2D6'nın güçlü inhibitörleridir. Fluoksetin, fluvoksamin ve paroksetin gibi bazı seçici serotonin geri alım inhibitörleri, CYP2D6 aktivitesinin güçlü inhibitörleridir. Bu nedenle, çoklu dozaj CYP2D6'nın otomatik olarak inhibisyonuna ve NM fenotipinin ZM fenotipine dönüşmesine ve UM fenotipinin NM fenotipine dönüşmesine neden olmuştur (Lam ve ark., 2002; Laine ve ark., 2001). Fluvoksamin durumunda, CYP2D6 genotipleri arasındaki konsantrasyon-zaman eğriliklerindeki (AUCs) farklar tekli dozlardan sonra açıklanırken (Spigset ve ark., 1997; Carrillo ve ark., 1996), çoklu dozlar ZM'lerde ve NM'lerde benzer AUC'ler ile sonuçlanmıştır, NM'lerde CYP2D6 üzerinde güçlü bir inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir (Spigset ve ark., 1998). Fluoksetin, S-enantiyomerine enantioselektif metabolizma geçirdiği için CYP2D6 ZM'lerinde S-fluoksetinin bozulmuş demetilasyonu gözlemlenmiştir (Eap ve ark., 2001). Ancak, metabolit desmetilfluoksetin de aktif bir antidepresan olduğundan, ana ilaç olarak fluoksetin'in değişken metabolizması ile ilgili herhangi bir klinik etki beklenemez (Fuller ve ark., 1992). Paroksetin için, aynı zamanda bir CYP2D6 inhibitörü olmasına rağmen, CYP2D6 ZM'lerde çoklu dozdan sonra NM'lerden iki kat yüksek AUC'ler gözlenirken (Sindrup ve ark., 1992), bir başka çalışmada, en az üç fonksiyonel CYP2D6 gen kopyası taşıyan bir UM, saptanamayan ilaç konsantrasyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Lam ve ark., 2002).

İnhibitörler geri dönüşümsüz inhibitörler veya geri dönüşümlü inhibitörler olabilir. Geri dönüşümsüz inhibitörlere örnek olarak simetidin, paroksetin, pimozid, metamfetamin, metoklopramid ve desetilamiodaron verilebilir. Bazı substratların ve diğer bileşiklerin, CYP2D6'yı geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Olanzapin, klorpromazin, flufenazin, haloperidol, tioridazin, risperidon, klozapin, triflupridol gibi antipsikotikler CYP2D6 tarafından metabolize edilir ve bu enzimleri önemli ölçüde inhibe eder. Amitriptilin, imipramin ve fluoksetin gibi antidepresanlarla birlikte uygulandığında, bunların plazma konsantrasyonu artar. Terfenadin gibi H1 reseptör antagonistleri, terbinafin gibi antifungal ajanlar CYP2D6 inhibitörleridir. Nortriptilinin terbinafin ile kullanımı, hastalarda supratherapötik ilaç düzeylerine neden olur. Ritonavir gibi pek çok proteaz inhibitörü güçlü inhibitörlerdir ve ritonavirin birlikte uygulanması desipraminin atılımını % 59 azaltır. Progesteron, testosteron gibi steroidler inhibitörlerdir ve temel azot atomlarından yoksun oldukları için atipik substratlar olarak adlandırılırlar. Güçlü bir inhibitör olan Lansoprazole, dekstrometorfanın dekstrofa dönüşmesini azaltmaktadır. CYP2D6, amfetamin analoglarını metabolize eder ve ilaçların birikmesine ve toksisiteye neden olabilecek etkisini inhibe eder. Panax ginsengi, Ginkgo biloba gibi birçok doğal ürünler, CYP2D6 aracılı debrizokin metabolizmasınıninhibe etmektedir (John ve ark., 2008). CYP2D6 inhibitörlerinin listesi Çizelge 1.2'de yer almaktadır (Abraham ve Adithan, 2001).

Çizelge 1.2. CYP2D6 İnhibitörlerinin Listesi

CYP2D6 İnhibitörleri			
Ajmalicine	Ajmalin	Amitriptilin	Amesergid
Aprindin	Budipin	Bufuralol	Klorokuin
Klorpromazin	Simetidin	Cis Tiotiksen	Sitalopram
Klomipramin	Klozapin	Desmetilimipramin	Difenhidramin Flfenazin
Flekainid	Fluvoksamin	Fluoksetin	Metadon
Halofantrin	Haloperidol	Levomepromazin	Paroksetin
Meklobemid	Olanzapin	Oxprenolol	Propranolol
Perazin	Perfenazin	Propofenon	Reboksetin
Kinidin	Kinin	Ranitidin	Terfenadin
Resperidon	Sertralin	Terbinafin	Yohimbin
Tiyoridazin	Tiklopidin	Venlafaksin	

1.2.4. CYP2D6 İndükleyicileri

CYP enzim ailesinin birçok üyesinin aksine, CYP2D6 enzimi, fenobarbitol gibi klasik enzim indükleyicilerinden etkilenmez. Rifampisin tedavisi, sparteinin atılımında yalnızca % 30'luk bir artış sağlamıştır ancak metabolik oran önemli ölçüde değişmemiştir (Eichelbaum ve ark., 1986). Kontraseptif kullanan ve NM olan kadınlarda debrizokuin metabolizma oranında yaklaşık % 33'lük azalma gözlenmiştir (Kallio ve ark., 1988). Adet döngüsü sırasında, luteal fazda preovulatuvar faza kıyasla debrizokin metabolik oranında önemli bir azalma olmamıştır (Wandelius ve ark., 1997; Kashuba ve ark., 1998). Ağır sigara ve ovariektomi, bu enzim aktivitesini indüklemiştir, ancak yalnızca az bir oran sağlamıştır. Buna karşın, gebeliğin CYP2D6 etkinliği üzerinde derin etkisi olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Gebelikte metoprolol (Hogstedt ve ark., 1985) ve dekstrometorfan (Wandelius ve ark., 1997) metabolizmasında belirgin artış bildirilmiştir.

1.2.5. CYP2D6 Fenotipleme

Bir kişinin fenotipi veya CYP2D6 in vivo metabolik kapasitesi, en çok CYP2D6 tarafından metabolize edilen bir prob ilacı verilerek belirlenir. İdrar belli bir süre boyunca toplandıktan sonra prob ilacın ve onun metabolitlerinin konsantrasyonları belirlenir ve bunların bir oranı olan metabolit oranı (MO) hesaplanır (Frank ve ark., 2007; Gonzalez ve Mayer, 1991; Schmid ve ark., 1985). Non-invaziv üriner metabolik oranlarda sınırlamalar vardır, ama klinik olarak daha yararlı olan ilaç klerensi gibi farmakokinetik verilerin yokluğunda metabolik kapasite için yedek ölçümler olarak görülmelidir (Abduljalil ve ark., 2010; Funck-Brentano ve ark., 2005). Fenotip durumunu belirlemek için metabolitin serum (Jurica ve ark., 2012), plazma (Chladek ve ark., 2000) ve tükürük (Hu ve ark., 1998) oranları ve solunum testleri (Leeder ve ark., 2008) de kullanılmıştır, ancak fenotip dağılımı için belirli değerleri daha az tanımlanmıştır. CYP2D6 fenotipleme için farklı prob ilaçları kullanılır. Debrizokin ve spartein ile ilk fenotipleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dekstrometorfan (Schmid ve ark., 1985), metoprolol (Lennard ve ark., 1982) ve kodein (Yue ve ark., 1989), CYP2D6 aktivitesinin

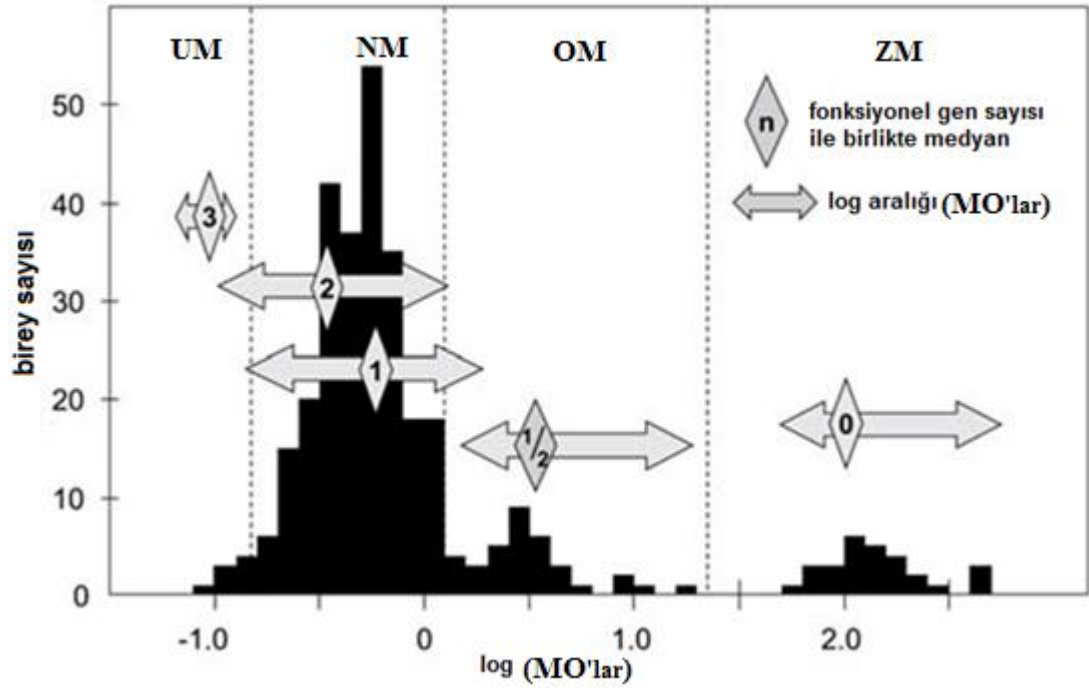
fenotiplenmesi için kullanılmıştır. Bir polimorfizm, iki popülasyon arasındaki anti mod ve bimodal frekans dağılım eğrisi ile gösterilmektedir. NM'leri ZM'lerden ayıran anti mod, iki grubun birbirinden ayırt edilmesinde temel oluşturmaktadır (Gonzalez ve Mayer, 1991).

Fenotip uygulamasının çeşitli sakıncaları da vardır. Kompleks test protokolleri, advers ilaç reaksiyonlarının riskleri, ilaçların birlikte uygulanması nedeniyle yanlış fenotipleme problemi ve hastalığın karıştırıcı etkilerinden zarar görmektedir (Linder ve ark., 1997). Bu yaklaşım, CYP2D6 ile metabolizma edilen ve / veya bu enzimi inhibe eden ilaçları aynı anda alan hastalarda doğru olmayan sonuçlarla karşılaşma olasılığını arttırır. (Kroemer ve Eichelbaum, 1995; Eichelbaum ve Gross, 1990). Birçok ilaç CYP2D6 inhibitörüdür (statinler gibi) ve bir CYP2D6 substratı ile birlikte bir inhibitör ilacı almak hastanın görünür fenotipini değiştirebilir. Bu fenomene fenokopi denir. Bu durum ortaya çıktığında, mevcut enzimlerin çoğunun aktivitesi çeşitli ilaçlarla engellendiği için, bir NM, kolaylıkla orta metabolizör (OM) veya ZM gibi görünebilir. CYP2D6 ile metabolize olan ilaçların kronik kullanımı ile ilgili fenotipe ise ofenokopi denir. Bu durumda, CYP2D6 substratı, ilaç konsantrasyonu sabit duruma yakın olduğunda zamanla kendi metabolizmasını inhibe edebilir (Gardiner ve Begg, 2006). Ancak, fenotipleme, enzim fonksiyonunu değerlendirmenin tek yaklaşımıdır. Eğer posttranslasyonel varyasyon bir bireyde CYP2D6 aktivitesine katkıda bulunursa, o zaman fenotip bu fenomeni tanımanın tek yolu olacaktır (Kroemer ve Eichelbaum, 1995). Fenotipleme, ilaç-ilaç etkileşimlerinin ortaya çıkarılmasında veya ilaç metabolizmasının genel sürecindeki sorunların ortaya konmasında yararlıdır (Linder ve ark., 1997).

Popülasyondaki farklı CYP2D6 enzim aktiviteleri nedeniyle hastalar dört metabolik gruba ayrılabilir. Fenotipik olarak, substrat ilaçların metabolik enzim oranlarının karşılaştırılmasına göre UM, NM, OM ve ZM olarak sınıflandırılırlar, Bu sınıflandırmaya göre Beyaz ırkda oranlar sırayla yaklaşık %3–5, %70–80, %10–17 and %5–10 olarak bulunmaktadır (Alván ve ark., 1990). Nihai fenotipik aktivite, en yüksek fonksiyonel allele bağlıdır (Theophilus ve ark., 2006).

ZM'ler, işlevsel bir protein ürününü kodlamayan iki işlevsiz alel taşırlar. Dolayısıyla, saptanabilir enzim aktivitesi göstermezler. Birçok çalışmada, CYP2D6 substratı ilaçlarla tedavi edilen ZM hastalarında klinik risk olduğu belirlenmiştir

(Zanger ve ark., 2004; Brockmoller ve ark., 2002; Wuttke ve ark., 2002). Debrizokin, dekstrometorfan, metoprolol ve spartein, in vivo fenotiplendirme için kullanışlı prob ilaçlarıdır. MO'nun bimodal veya üç köşeli dağılımı genel olarak Avrupa popülasyonlarındaki ZM fenotipinde bulunur ve ZM fenotipi her zaman bir antimodal tarafından açıkça tanımlanabilen tek bir alt grubu temsil eder. Örneğin, debrizokin MO 12.6 ve spartein MO 20 (Şekil 1.4). Türk bireylerde yapılan çalışmada, metabolizörler yukarıda açıklanan dört problu ilaçla doğru olarak tanımlanmıştır (Bozkurt ve ark., 1996), Ancak bazen prob ilaçları arasındaki tutarsızlıklar bildirilmiştir. Bir bireyin MO'nun uzun yıllar boyunca kararlı olduğu ve çevresel faktörlerin (Steiner ve ark., 1985; Bock ve ark., 1994) veya rifampin veya oral kontraseptifler ve benzodiazepinler gibi diğer metabolik yolları tetikleyen ilaçlardan önemli ölçüde etkilenmediği gösterilmiştir (Syvalahti ve ark., 1986).



Şekil 1.4. Rastgele bir Avrupa nüfusunda fenotip tanımı ve dağılımı (N = 316). Dört fenotipin spartein MO aralıkları dikey çizgiler ile gösterilir: UM'ler: $MO < 0.15$; NM'ler: $0.15 \leq MO \leq 1.2$; OM'ler: $1.2 < MO < 20$; ve ZM'ler: $MO \geq 20$. 0, 1, 2 veya 3 fonksiyonel geni olan genotiplere karşılık gelen spartein MO'nin medyan ve aralığı, azalmış bir fonksiyona sahip bir fonksiyonel alelin varlığını gösteren bir 1/2 gen dozu olan oklarla gösterilir (örn., $2D6 * 41$, $* 9$ veya $* 10$) (Zanger ve ark., 2004).

OM'ler terimi, azalmış CYP2D6 aktivitesini gösteren belirgin olarak artmış metabolik oranlar sergileyen bireyleri tanımlamak için ilk olarak 1979'da tanımlanmıştır (Eichelbaum ve ark., 1979). OM olarak sunulan deneklerin çoğunda

bir değişikliğe uğramış ve bir boş allel içeren genotipler bulunur (Gaedigk ve ark., 2008; Zanger ve ark., 2004; Zanger ve Schwab, 2013). OM'ler terimi, Spartein (Eichelbaum ve ark., 1979) ve debrizokin (Steiner ve ark., 1988) için MO frekans dağılımları, ana NM modu ve ZM modu arasında açıkça daha fazla veya daha az ayrı bir alt grup gösterdiğinden dolayı ortaya çıkmıştır (Şekil 4). OM fenotipik aralığı, matematiksel modelleme ile tanımlanmıştır ve OM fenotipinin frekansı, normal Avrupa nüfusunun yaklaşık% 10-15'ini oluşturduğu tahmin edilmiştir (Bock ve ark., 1994). Hardy-Weinberg dengesinin, gözlemlenen ZM frekansına göre yaklaşık % 35 ila 40 arasında bir heterozigot frekansını doğru bir şekilde öngördüğü için OM fenotipinin sadece bir fonksiyonel ve bir fonksiyonel olmayan alleli taşıyan heterozigotları yansıtamadığı vurgulanmalıdır. Çeşitli farmakokinetik çalışmalar OM fenotipinin ilaç oksidasyon kapasitesinin ciddi şekilde azaldığını ve özellikle uzun süreli tedavinin koşulları altında ZM'lerinkiyle karşılaştırılabilir olabileceğini düşündürmektedir (Dalén ve ark., 1998). Uzun süreli metoprolol tedavisi üzerine yapılan bir çalışmada Rau ve ark. (2002) OM fenotipi olan hastaların plazma konsantrasyonlarının, ZM'lerden anlamlı olarak farklı olmadığını bulmuşlardır.

NM'ler, yaklaşık iki düzende metabolik oranları kapsar ve iki azaltılmış, bir fonksiyonel ve bir boş, bir azalmış ve bir fonksiyonel veya iki fonksiyonel allel içeren bireyleri kapsar. Her ne kadar NM alt grubu belirgin olmasa da, iki işlevsel allel değişikliği olan bireyleri, ortalama olarak iki tam işlevli alleli olan bireylere kıyasla daha az aktiviteye sahiptir (Dalén ve ark., 1998; Johansson ve ark., 1993; Kirchheiner ve ark., 2004a; Kirchheiner ve ark., 2004b; Kirchheiner ve ark., 2005; Kirchheiner ve ark., 2007).

UM'ler, üç (veya daha fazla) fonksiyonel gen kopyasına sahip olan kişilerde farmakokinetik çalışmalarla gösterildiği gibi, substratı metabolize etme veya temizleme uzaklaştırma kabiliyeti son derece yüksek bireyleri tanımlamaktadır (Dalén ve ark., 1998; Johansson ve ark., 1993; Kirchheiner ve ark., 2004a; Kirchheiner ve ark., 2004b; Kirchheiner ve ark., 2005; Kirchheiner ve ark., 2007). Bertilsson ve ark. (1985), son derece yüksek ilaç oksidasyon kapasitesini (UM fenotipi) ilk kez, debrizokin MO değeri 0.07 olan ve terapötik plazma seviyelerine ulaşmak için anormal derecede yüksek miktarda nortriptyline ihtiyaç duyan bir depresif kadında tanımlamıştır. OM fenotipinden farklı olarak, UM fenotipine

karşılık gelen belirgin bir alt grup oluşturulamamasına rağmen, MO dağılımı normallikten bazı sapmalar göstermektedir. Bununla birlikte, klinik önemi nedeniyle ve UM fenotipine neden olan en az bir genetik mekanizma var olduğundan (Johansson ve ark 1993; Ingelman-Sundberg 1999b), NM ve UM arasında bir MO eşiği tanımlamak yararlı görünmektedir. Bu eşik, çeşitli çalışmalarda kullanılan prob ilacına bağlı olarak MO = 0.15 ila 0.2 arasındaki değerlere ayarlanmıştır (Dahl ve ark 1995a; Johansson ve ark., 1996; Sachse ve ark., 1997; Griese ve ark., 1998).

1.2.6. CYP2D6 Genotipik Analizi

Genotipleme, spesifik ilaç metabolizmasına neden olan tanımlanmış genetik mutasyonların belirlenmesini içermektedir. Bu mutasyonlar aşırı ekspresyona (gen çoğalması), aktif bir protein ürününün olmamasına (boş allele) veya azalmış katalitik kapasiteye sahip mutant bir proteinin üretilmesine (inaktif allele) neden olan genetik değişikliklerdir (De Leon ve ark., 2009).

Genotipleme için periferik lenfositlerden izole edilen DNA kullanılabilir. Genotiplemede yaygın olarak kullanılan iki yöntem polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR-RPUP) yöntemi ve allele-spesifik PZR'dir (Linder ve ark., 1997). Önceki teknikte, ilgilenilen genin spesifik bölgesi, PZR ile çoğaltılır ve ardından çoğaltılan DNA ürününün restriksiyon endonükleazlarla kesimi yapılır. Kesim ürünlerinin boyutu etidyum bromür (Et2Br) boyama ve UV (Ultraviyole) transillüminasyonu ile agaroz jel elektroforezi ile kolayca saptanır (Linder ve ark., 1997; Sachse ve ark., 1997). Allel spesifik PZR amplifikasyonunda, paralel amplifikasyon reaksiyonları için ortak veya değişken allellere hibridizasyona özgü oligonükleotidler kullanılmaktadır. Uygun bir amplifikasyon ürününün bulunup bulunmadığı agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir (Daly ve ark., 1999; Heim ve ark., 1990).

Bu genotipleme yöntemleri, az miktarda kan veya doku gerektirir, hastalıklardan veya hastanın ilacından etkilenmez ve 48-72 saat içinde sonuç verir ve hızlı müdahale sağlar (Linder ve ark., 1997). Bilinen farklı alellerin sayısı artmakta ve toplamda 30'dan fazla farklı kusurlu CYP2D6 ve 55 CYP2D6 varyasyonu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, etnik gruba bağlı olarak, sadece 5-6 en yaygın farklı

allelin genotiplemesi CYP2D6 fenotipini yaklaşık % 95-99 kesinlikle tahmin edecektir (Ingelman-Sundberg ve ark., 1999a; Aynacioglu ve ark., 1999). Örneğin, Beyaz Irk (Wolf ve Smith, 1999), Çin / Japon (Tateishi ve ark., 1999) ve Siyah Afrikalı / Afro-Amerikalı (Ingelman-Sundberg ve ark., 1999a) nüfustaki en yaygın CYP2D6 varyant alleli, sırasıyla CYP2D6 * 4, * 10 ve * 17 dir.

1.2.7. CYP2D6 Genetik Polimorfizmi

Genetik polimorfizm, insan vücudunun ilaç yanıtındaki farklılıkların önemli bir sebebidir (Petsalo ve ark., 2008). İnsan ilaç metabolizmasının polimorfizmi fenotip ve genotip ile ayırt edilebilmektedir. Fenotip (ifade edilen tip), bir enzimin aktivitesi veya içeriği ile ayırt edilmektedir. Diğer taraftan ise, genotip, kan veya saç kökü gibi biyolojik materyallerin DNA analizi ile saptanan mutasyondan ayırt edilmesidir (Meyer, 1990). CYP2D6, indüklenemeyen tek ilaç metabolizma edici CYP dir, ve bu nedenle genetik varyasyonlar, bireyler arasında enzim aktivitesindeki değişikliklere büyük ölçüde katkıda bulunur (Bozina ve ark., 2009). Yabani-tip (Wild-type) CYP2D6 aleline göre, CYP2D6 geninin varyant versiyonları, enzim aktivitesinin tamamen yok olmasına, düşük aktivitesine, normal aktivitesine ve hatta artmış aktivitesine neden olabilir (Gaedigk ve ark., 2006; Gaedigk ve ark., 2002). Dolayısıyla, CYP2D6 gen varyantları, null (ZM), azalmış (OM), normal (NM) ve ultrarapid (UM) aktivitesine neden olan alellere ayrılır (Mittal ve ark., 2015). Çizelge 1.3 burada kullanılan terimlerin tanımlarını sağlar (TheFreeDictionary, 2018; Cartwright ve ark., 2013).

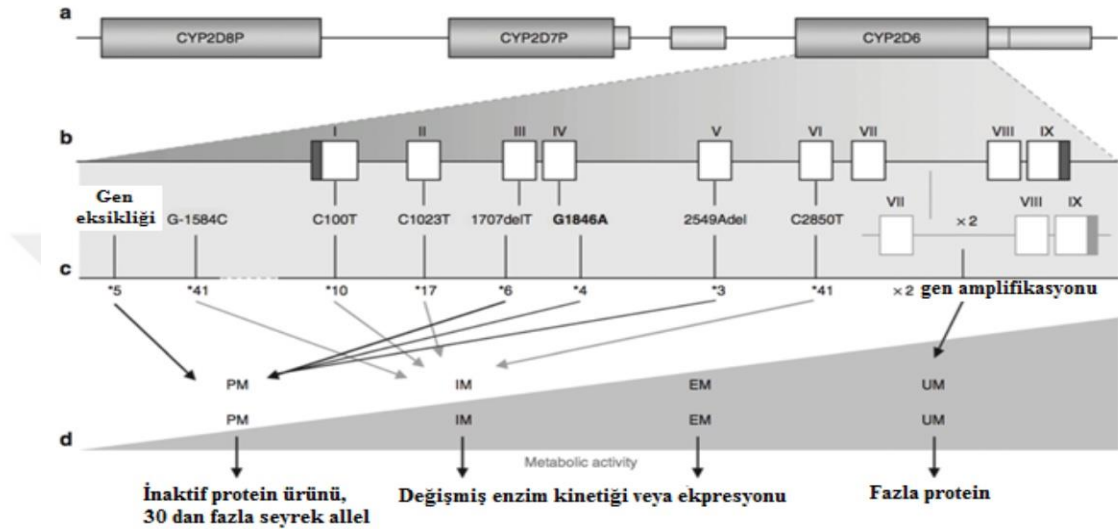
Çizelge 1.3. Tanımlar

Genotip	Bir bireyin veya grubun genetik yapısının tamamı veya bir kısmıdır.
Fenotip	Genotipin ve çevrenin etkileşimi ile üretilen bir organizmanın gözlenebilir özellikleri.
Yabani tip alel (Wild-type)	Doğal veya laboratuvar mutant formlarının aksine doğal organizma popülasyonunda baskın olan bir fenotip, genotip veya gen.
TNP	Tek nükleotid polimorfizmi; Tek bir nükleotitin pürin veya pirimidin bazının başka bir bazla değiştirildiği bir varyant DNA dizisi.
Alel	Belirli bir lokusta meydana gelebilecek bir genin alternatif formlarından herhangi biri.
Boş alel	Tespit edilebilir bir etki üretmeyen bir alel.

İnsan CYP2D lokusunun evrimi, üç genin eliminasyonunu, ikisinin (CYP2D7P ve 2D8P) inaktivasyonunu ve birinin (CYP2D6) kısmi inaktivasyonunu içermektedir (Gaedigk ve ark., 2006; Gaedigk ve ark., 2002). Çoğu CYP2D6 allelik varyantları, tek nükleotid polimorfizmleri (TNP'ler) ve bir veya birkaç nükleotidlerin eklenmesi veya çıkarılmasını içeren bir veya daha fazla tek nükleotid polimorfizmleri (TNP'ler) varlığı ile karakterize edilir. Diğer alleller, çok sayıda silme, gen duplikasyonları ve CYP2D6 ve CYP2D7'den oluşan çoğullama (multiplikasyon) veya hibrid genlere neden olan gen yeniden düzenlemeleri ile karakterize edilir. Ek olarak, bazı CYP2D6 allelleri, sırasıyla CYP2D7 intron 1 ve ekzon 9 dönüşümleri olarak adlandırılan küçük CYP2D7 türevli segmentler içerir veya bu pozisyonda CYP2D7 dizisine karşılık gelen bir veya birden fazla TNP içerir. Sekans varyasyonları işlevi tamamen yok edebilir, enzimin farmakokinetik özelliklerini değiştirebilir veya ek fonksiyonel gen kopyaları taşıyan kişilerde artmış işleve yol açabilir veya hiç fonksiyonel bir sonuca sahip olmayan duruma neden olur (Oscarson ve ark., 1997; Wennerholm ve ark., 2002).

CYP2D6'yı kodlayan gen, oldukça polimorfiktir (Şekil 1.5) (Batty ve ark., 2014; Cai ve ark., 2000). Şimdiye kadar, CYP2D6'nın 50'den fazla mutasyon ve 100'den fazla alleli keşfedilmiştir, bunların birçoğu ZM fenotipe neden olmaktadır (Ingelman-Sundberg ve ark., 2000). Diğer daha iyi korunmuş CYP izoformlarının (örn., CYP3A4 gibi) aksine, birçok CYP2D6 alleli, yabani (Wild-type) enzimle kıyaslandığında azalmış veya hiç fonksiyona sahip olmayan enzimleri kodlamaktadır. Bireyler aynı zamanda bir kromozomda CYP2D6 geninin ikiden

fazla kopyasıyla (gen duplikasyonu) veya bir veya iki kromozomda CYP2D6 geninin tam yokluğunda (gen silme) gen yeniden düzenlemelerine sahip olabilirler. Bu nedenle, belirli bir bireyde CYP2D6 allellerinin kombinasyonuna bağlı olarak, CYP2D6 enzimiyle ilişkili ilaç metabolik aktiviteler geniş ölçüde değişebilir (Haufroid ve Hantson, 2015).



Şekil 1.5. Sitokrom P450 (CYP) 2D6 lokusunun polimorfizmi. (a) CYP2D6 geninin genotiplenmesi zordur, bu lokus (b, c) iki veya daha fazla yüksek homolog polimorfik psödogen içerir. Bütün gen delesyon ve duplikasyonlarına ek olarak, CYP2D6 lokusunun kodlayıcı / promotor bölgesinde 80'den fazla polimorfizm bilinmektedir. (d) Genel polimorfizmler (1846G> A CYP2D6 * 4 polimorfizmi, kalın olarak gösterilmiştir) ve bunların fenotipik etkileri gösterilmiştir (Battyve ark., 2014).

1.2.7.1. CYP2D6 Alelleri ve Enzim Aktivitesine Etkileri

Allelik varyantlar arasında, tam işlevsel alleller, azalmış fonksiyonu olan alleller ve boş (fonksiyonel olmayan) alleller bulunmaktadır. Fonksiyonel allellerin duplikasyonu artmış gen ekspresyonu ve enzim aktivitesine yol açmaktadır. CYP2D6 genetik ekspresyonu ksenobiyotiklerle indüklenemediğinden, genetik faktörlerin CYP2D6'nın fenotipik görüntüsünde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Dahl ve ark., 1995; Dalén ve ark., 1995).

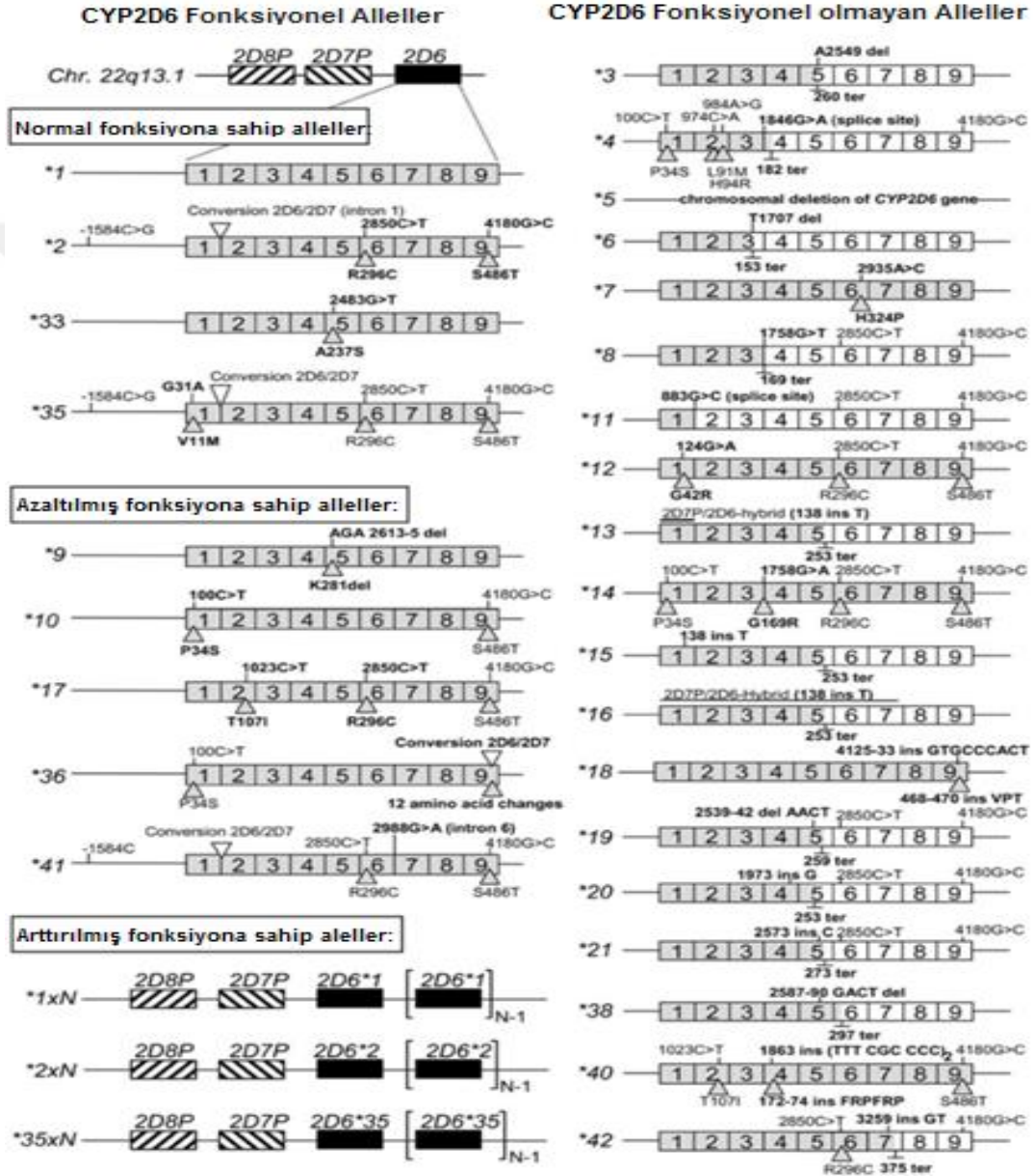
CYP2D6'nın boş allelleri, fonksiyonel bir proteini kodlamaz ve saptanabilir kalıntı enzim aktivitesi yoktur. Aleller *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *19, *20, *21, *38, *40, *42, *44, *56 ve *62 enzim aktivitesine sahip değildir. Homozigot veya bileşik heterozigot grubunda bulunduğu ZM

fenotipinden sorumludurlar. Bu alleller, sıklıkla ilaç klerensi ve ilaç yanıtında değişikliklere neden oldukları için klinik öneme sahiptir. Bu boş allellerden *3, *4, *5 ve *6, Beyaz ırklarda ZM fenotipine neden olan tüm allellerin ~% 97'sini oluşturmaktadır (Sachse ve ark., 1997). CYP2D6'nın null alellerinden kaynaklanantoplam enzim fonksiyon kaybı için mekanizmalar aşağıdakileri içerir: (a) okuma çerçevesini kesen veya doğru ekleme işlemi engelleyen, tekli baz mutasyonlar veya küçük eklenmeler/çıkmlar (insertions/deletions), erken sonlanan protein / durdurma kodonlarına yol açar (örneğin CYP2D6 *3, *4, *6, *7, *8, *11, *15, *19, *20, *38, *40, *42, *44, *56 ve *62) (Kagimoto ve ark., 1990); (b) işlevsel olmayan tam uzunlukta kodlanmış alleller (örn., CYP2D6*12, *14 ve *18) (Evert ve ark., 1997), (c) büyük bir sekansın silinmesi (örneğin, CYP2D6 * 5) nedeniyle tüm CYP2D6 geninin silinmesi ve (d) Heterozigot genin oluşumu (örn. *13 ve *16; *13 ve *16'daki büyük sekanslar silinir ve bu nedenle hepsi CYP2D7-2D6 hibrid genini içerir) (Gaedigk ve ark., 1991).

Kısmi veya rezidüel fonksiyona sahip alleller, CYP2D6*10, *14, *17, *18, *36, *41, *47, *49, *50, *51, *54, *55 ve *57'dir. Azalmış enzim aktivitesi genellikle düşük protein stabilitesi, bozulan substrat tanıma ve düşük substrat enzim afinitesine bağlıdır. *17 gibi bazı aleller için enzim aktivitesindeki değişim substrat bağımlı olabilir. Bu alellerden birini barındıran bireyler ZM'ler veya OM'lerdir (Zhou ve ark., 2009).

Fonksiyonel çalışmalar, *2A, *17 × 2, *35, *41 × 2 ve *48 dahil olmak üzere, CYP2D6'nın birkaç alellerinde değişmiş enzim aktivitesi olmadığını göstermiştir. CYP2D6 *27, *39 ve *48 allelleri, yabancı tip proteine kıyasla, büyük oranda normal aktiviteye sahip enzimleri kodlamaktadır (Sakuyama ve ark., 2008). COS-7 hücrelerinde ifade edilen CYP2D6.27 (E410K), CYP2D6.39 (S486T) ve CYP2D6.48 (A90V), yabancı tip enzimden biraz daha yüksek bir içsel klerens göstermiştir (Rowland ve ark., 2006). Ayrıca CYP2D6 *2B, *2C, *2D, *2E, *2F *2G, *2H ve *2K'ler de tanımlanmıştır (Marez ve ark., 1997). Gaedigk ve arkadaşları, * 2 serisinde iki alel daha tanımlamıştır: *2L ve *2M, ve bunlar çoklu mutasyonlar (örneğin, 310G> T, 746C> G ve 843T> G) içermektedir. -1584C> G, -1235A> G, -740C> T ve -678G> polimorfizmleri CYP2D6 *2 alelinin çoğu altvaryantında (*2A → *2H ve *2J → *2N; *2J = *59) bulunabilmektedir (Gaedigk ve ark., 2005a ve

2005b). Intron 1'deki CYP2D7 gen dönüşümü büyük olasılıkla *2 allelinin çoğu altvaryantında da bulunabilir. Fonksiyonel etkileri henüz bilinmemektedir, ancak enzim aktivitesi üzerinde çok az etkisinin olması beklenmektedir (Raimundo ve ark., 2000; Johansson ve ark., 1993). Fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan CYP2D6 allellerinin yapısı Şekil 1.6'de gösterilmektedir (Zanger ve ark., 2004).



Şekil 1.6. Fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan CYP2D6 allellerinin yapısı. Sadece mevcut fenotipik bilgileri olan alleller gösterilmektedir. 9 ekzon, üstte belirtilen DNA polimorfizmleri ile numaralandırılmış kutular ile gösterilmiştir (del: delesyon/silme, ins: insertion/ ekleme). Tahmin edilen amino asit değişiklikleri ve translasyon sonlandırma kodları aşağıda belirtilmiştir. Açık okuma çerçeveleri gölgeli kutular ile belirtilmiştir. Sessiz mutasyonlar ve bazı promoter ve intronik polimorfizmlerin yanı sıra belirsiz fonksiyona sahip alleller gösterilmemektedir.

Son derece yüksek CYP2D6 aktivitesi, eşitsiz geçme/çaprazlama olayları (unequal crossover events) ve diğer mekanizmaların bir sonucu olarak, kafadankuyruğa yönelimde kaynaşmış fonksiyonel alellerin (örneğin, * 1 ve * 2) gen duplikasyonu /çoklu-duplikasyonundan kaynaklanmaktadır, aşırı hızlımetabolizmaları olan hastalarda CYP2D6 lokusunun moleküler karakterizasyonu ile dikkat çekilmiştir (Bertilsson ve ark., 1993). Gen gen duplikasyonu / çoklu-duplikasyonu, eşitsiz geçme/çaprazlama olaylardan (unequal crossover events) ve diğer mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Gen duplikasyonu ve CYP2D6'nın çoklu-duplikasyonu fonksiyonel, kısmen fonksiyonel ve fonksiyonel olmayan enzimlere yol açabilir. Bir araştırma aşağıdaki gen duplikasyonlarını ortaya çıkarmıştır: * 1 N, * 2 N, * 4 N, * 6 N, * 10 N, * 17 N, * 29 N, * 35 N, * 43 N ve * 45 N. Aktif CYP2D6 geninin duplikasyonu/çoklu-duplikasyonu, ultra-hızlı enzim aktivitesi ile sonuçlanmaktadır (Gaedigk ve ark., 2007).ve ark., 1993).

1.2.7.2. CYP2D6 Polimorfizmlerinin Popülasyon Frekansları

Alellerin dağılımı, farklı etnik gruplar arasında büyük ölçüde farklılık gösterir, bu da farklı oranlarda metabolizörlere neden olmaktadır. ZM'ler çoğunlukla Avrupa'da bulunmaktadır, UM'ler Kuzey Afrika ve Okyanusya'da, OM'ler ise esas olarak Asya'da bulunmaktadır. Doğu Asya popülasyonları, ZM'in düşük oranına (% 0–2), beyaz Avrupalılar en yüksek oranına (% 3-10) sahiptir; Siyah Afrikalılar ve Afrikalı Amerikalılar ise % 2-7 arasında değişmektedir (Ingelman-Sundberg ve ark., 2007; Llerena ve ark., 2009; Teh ve Bertilsson, 2012). Benzer şekilde, OM, NM ve UM frekansları da popülasyonlar arasında büyük ölçüde değişebilir. Çizelge 1.4 ırk veya etnik kökene göre gruplandırılmış en yaygın varyantların alel frekanslarını özetlemektedir. Tablo 1'de gösterilen ortalama alel frekansları, yazar tarafından periyodik olarak güncellenen ve PharmGKB aracılığıyla erişilebilen alel frekansları hakkında rapor veren 120 yayının bir derlemesinden hesaplanmıştır.

CYP2D6*2, İsveçli Beyaz ırklarda % 1-2 (Griese ve ark., 1998), Almanya'da % 3,6 (Sachse ve ark. 1997), Beyaz İspanyollarda % 7–10 (Agundez ve ark., 1995; Bernal ve ark., 1999) ve İtalya'daki Sicilya'da % 10 (Scordo ve ark.,1999) oranındaki alel frekansı ile ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, daha yüksek frekanslar Suudi

Arabistan'da (% 20) (McLellan ve ark. 1997) ve siyah Etiyopyalılarda (% 29'a kadar) görülmüştür (Aklillu ve ark. 1996). Bu alel Asyalılarda neredeyse hiç mevcut değildir. Fonksiyonel olmayan CYP2D6*4 allellerinin sıklığı, bazı Doğu Asya ve Okyanusya popülasyonlarında son derece düşük veya hatta olmayabilir (Lee ve ark., 2009; Myrand ve ark., 2008; Qin ve ark., 2008; Sistonen ve ark., 2007; Von Ahsen ve ark., 2010), Avrupalıların sıklığı% 15-20 arasındayken, Faroe Adaları tarafından bildirilen% 30'u geçebilmektedir (Halling ve ark., 2005). Aksine, Asyalılar, CYP2D6*10 azalmış fonksiyon allelinin% 64'üne kadar (ortalama% 42) yüksek frekanslarda açıklanabilen üriner metabolik oranları karşılaştırarak popülasyon bazında genel olarak daha yavaş CYP2D6 aktivitesine doğru belirgin bir değişim göstermektedir. Diğer popülasyonlarda CYP2D6*10'un frekansı % 3-7 arasında değişmektedir. Beyaz Avrupalılar dağılımın en alt noktasındadır. CYP2D6*17, siyah Afrika ve Afrika kökenli Amerikalılarda % 14–26 arasında görülmektedir.

Fonksiyonel CYP2D6 gen duplikasyonlarının frekansları da önemli ölçüde değişebilir (Ingelman-Sundberg ve ark., 2007). Kuzey Avrupalıların yaklaşık % 2'sinde CYP2D6*1xN veya *2xN bulunur, Akdeniz, kuzey Afrikalılar ve Orta Doğulular için frekanslar daha yüksektir (% 5–10); Etiyopyalılarda (Aklillu ve ark., 1996) ve Papua Yeni Gine'de (von Ahsen ve ark., 2010) sırasıyla % 16 ve% 13 gibi yüksek oranlar görülmüştür.

Çizelge 1.4. Popülasyonlardaki CYP2D6 alel frekansları (Hicks ve ark. 2013'ten hafif modifikasyonlarla).

Alel	Afrika- lılar	Afrika Kökenli Amerika- lılar	Beyaz Irklar (Avrupalılar +Kuzey Amerikalılar)	Orta Doğu -lular	Doğu Asya- lılar	Güney / Orta Asya- lılar	Amerik -alılar	Oky- anusya- lılar
*1a	0.39	0.41	0.52	0.59	0.34	0.53	0.62	0.70
*2b	0.20	0.12	0.27	0.24	0.12	0.31	0.24	0.012
*3	0.0003	0.0034	0.013	0.0013	0.00	0.00	0.0052	0.00
*4	0.033	0.06	0.18	0.076	0.0045	0.065	0.11	0.011
*5	0.06	0.058	0.028	0.023	0.058	0.025	0.016	0.049
*6	0.00	0.0027	0.0091	0.0096	0.0002	0.00	0.005	0.00
*7	0.00	0.00	0.0012	0.00	0.00	ND	0.00	0.00
*8	0.00	0.00	0.0003	0.00	0.00	ND	0.0015	0.00
*9	0.0010	0.0054	0.02	0.00	0.0008	0.014	0.013	0.00
*10c	0.067	0.043	0.028	0.035	0.42	0.19	0.034	0.016
*14	0.0013	0.00	0.00	0.00	0.0092	0.00	0.0047	0.00
*17d	0.19	0.18	0.0027	0.014	0.0002	0.0038	0.023	0.0005
*41e	0.10	0.10	0.092	0.22	0.22	0.10	0.057	0.00
xNf	0.075	0.043	0.028	0.067	0.015	0.013	0.033	0.088
*1xNg	0.014	0.0044	0.0077	0.038	0.0031	0.0050	0.0078	0.11
*2xNg	0.015	0.016	0.013	0.036	0.0042	0.0050	0.023	0.00
*4xNg	0.014	0.020	0.0028	0.00	0.00	0.00	0.0036	0.00

ND, belirlenmemiş

Bu tablo, çeşitli çalışmalarda her alel için rapor edilen ortalama frekansları göstermektedir.

İrk / etnisite, İnsan Genom Çeşitlilik Projesi-Merkezi d'Etude du Polymorphisme Humain'e (HGDP-CEPH) göre ayrılmıştır (Rosenberg ve ark., 2005).

a CYP2D6*1 doğrudan genotiplemediğinden, bir dizi varyasyonu için negatif olan allellerin bir CYP2D6*1 ataması varsayılan olarak belirlenmektedir. Benzer şekilde test edilmeyen allellerin sekans varyasyonları da bir CYP2D6*1 ataması için varsayılandır ve dolayısıyla bu alel için rapor edilen frekanslara katkıda bulunur. CYP2D6*1 için çıkarılan frekans aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır: 1- (varyant alel frekanslarının toplamı).

b CYP2D6*2 bir 'varsayılan' atamadır ve CYP2D6*8, *11, *17, *35, *41 için test edilmedikçe ve ayırım yapılmadıkça, CYP2D6*2 ataması varsayılan olacaktır. Bu nedenle burada gösterilen frekanslar aşırı tahmin edilmiş olabilir.

c,d CYP2D6*10 ve CYP2D6*17 ayrıca 'varsayılan' atamalarıdır ve CYP2D6*14 ve CYP2D6*40 ve *58 gibi alellerin test edilmesi ve ayırım yapılmaması durumunda sırasıyla CYP2D6*10 ve*17 atamaları varsayılan olacaktır. Bu nedenle burada gösterilen frekanslar aşırı tahmin edilmiş olabilir.

e CYP2D6 *41, çalışmalar boyunca tanımlayıcı TNP (2988G A) tarafından sürekli olarak belirlenmemiştir; Bazı platformlar hala CYP2D6*2 ve *41 arasında ayırım yapmak için 1584C G TNP kullanılmaktadır. Bu, özellikle Afrikalılarda ve onların torunlarında CYP2D6 * 41 frekansının aşırı tahmin edilmesine yol açabilmektedir.

f xN, doğasına bakılmaksızın tüm gen kopyalarını gösterir. Alellerin CYP2D6*2xN olarak rapor edildiğini, ancak CYP2D6*1xN veya *4xN gibi diğer kopyalardan özel olarak ayrılmamış olmaları xN olarak gösterilmiştir.

g Frekanslar sadece gen duplikasyonları arasında ayırt edilen çalışmalardan, yani CYP2D6*1xN, *2xN veya*4xN olarak belirtilen duplikasyonlardan hesaplanmıştır. Diğer duplikasyonlar mevcut olabilir ve daha az çalışma farklılaştırılmış gen duplikasyonları için veriye sahip olduğundan, CYP2D6*1xN, *2xN ve *4xN toplamı xN için gösterilen toplamdan daha azdır. xN, aynı zamanda, bir duplikasyon analizinde pozitif olan, fakat özdeş gen ünitelerinin kopyalarını taşımayan gen yeniden düzenlemeleri olan başka alelleri de içerebilir.

1.2.7.3. CYP2D6 Polimorfizmlerinin Klinik Önemi

Birçok klinik çalışma, bu enzim tarafından aktive veya inaktive edilen ilaçlara yanıt olarak CYP2D6 polimorfizminin klinik önemini belirlemektedir. Birçok antiaritmik ilaç, örneğin, metoprolol, timolol, propafenon ve diğer ilaçlar CYP2D6 tarafından metabolik olarak inaktive edilmekte olup, ZM'ler / OM'ler için artmış bir maruziyet ve advers etki riskine yol açmaktadır, ve klinik etkileri hala tartışılmaktadır. (Fux ve ark., 2005; Darbar ve Roden, 2006; Klotz, 2007; Mörike ve ark., 2008; Bijl ve ark., 2009; Rau ve ark., 2009). Birçok antidepresan ve antipsikotik CYP2D6 substratlarıdır ve oksidatif metabolizma genellikle inaktivasyona neden olur, bu da ZM / OM'lerde aşırı maruziyete ve UM'lerde düşük maruziyete yol açmaktadır. Yalnız bu ilaçların doğal olarak sorunlu dozlanması nedeniyle, klinik etkilerle ilgili çalışmalar tam bir uyum içinde değildir. (Kirchheiner ve ark., 2004; Bertilsson, 2007; Crisafulli ve ark., 2011; Stingl ve ark., 2012). Ağrı tedavisinde kullanılan kodein, dihidrokodin, oksikodon ve tramadol gibi çeşitli opioid ilaçlar CYP2D6 tarafından metabolik olarak aktive edilir ve genotipin etkililiğini ve güvenilirliğini etkilediği gösterilmiştir (Stamer ve ark., 2010; Leppert, 2011; Madadi ve ark., 2012). Kodein, CYP2D6 tarafından farmakolojik olarak aktif analjezik morfine O-demetile edilir. CYP2D6 ZM'lerde son derece düşük morfin plazma konsantrasyonları nedeniyle analjezik bir etki yoktur (Eckhardt ve ark., 1998). Aksine, kodeinin etkinliğinin artması ve bazen hayatı tehdit eden opioid toksisitesi, çok sayıda CYP2D6 gen kopyası olan hastalarda, ve aynı zamanda emziren anneleri

CYP2D6 UM'leri olan yenidoğanlarda da gözlenmiştir ve bu UM fenotipi olan hastalarda morfine daha yüksek oranda dönüşümü ile uyumludur (Gasche ve ark., 2004; Koren ve ark., 2006; Madadi ve ark., 2009).

Selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM) tamoksifen, en az 22 metabolite metabolize edilir, bunlardan ikisi, 4-hidroksitamoxifen ve ikincil metabolit endoksifenin, östrojen reseptörüne olan yüksek afiniteleri nedeniyle esas olarak antiöstrojenik etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Johnson ve ark., 2004; Mürdter ve ark., 2011b). CYP2D6, 4-hidroksilasyon için ana enzim olduğundan, CYP2D6 genotipinin, bu aktif metabolitlerin plazma konsantrasyonlarını ve bu nedenle tedavi sonucunu etkilemesi beklenmelidir (Dehal ve Kupfer, 1997; Coller ve ark., 2002; Johnson ve ark., 2004). Aktif enzim olan hastalarla karşılaştırıldığında, işlevsel olarak bozulmuş CYP2D6 hastalarında daha düşük aktif metabolit seviyeleri ortaya çıkmaktadır ve bu nedenle tedaviden daha az kazanç sağlamaktadır (Brauch ve ark., 2009). Bu hipotez son on yılda incelenmiştir ve ilk retrospektif çalışmalarda CYP2D6 ZM'lerin postmenopozal meme kanserinin tamoksifen monoterapisi ile adjuvan tedavisinden daha az yarar sağladığı bulunmuştur (Goetz ve ark., 2007; Schroth ve ark., 2007).

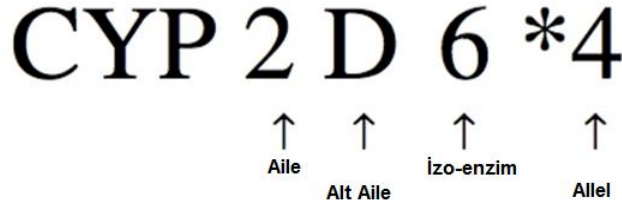
Ek olarak, CYP2D6 polimorfizmlerinin, ağrı duyarlılığı (Candiotti ve ark., 2009; Sindrup ve ark., 1993), şizofreni hastalarının semptomları (Plesničar ve ark.; Zahari ve ark., 2009), antipsikotik ilaçların yan etkileri (Tamminga ve ark., 2003; Topić ve tak, 2000) ve tamoksifen ile tedavi edilen meme kanseri hastalarında rekürrens riski gibi spesifik fenotipler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Teh ve ark., 2002).

1.3. CYP2D6*4 Alleli / 1846G> A (rs3892097)

CYP2D6 genindeki tek nükleotid polimorfizmi rs3892097 (c.1846G> A, literatürde 1934G> olarak bilinir), enzimin fonksiyonel olarak eksik bir varyantı ile sonuçlanır (CYP2D6*4 izomeri). Şu anda bunun enzim aktivitesinde bir eksikliğe yol açan sık bir CYP2D6 varyantı olduğu ve ZM durumuyla sonuçlandığı bilinmektedir (Christensen ve ark., 1998; Lu ve ark., 2013). CYP2D6'daki majör mutasyon, intron3 / ekzon 4'ün (CYP2D6*4) birleşimindeki 1,934 pozisyonunda

G'den A'ya olan değişimdir (Armstrong ve ark., 1992). CYP2D6 1846G> A, işlevsel olmayan bir proteinle sonuçlanan bir değişim kusuruna neden olmaktadır (Kagimoto ve ark., 1990). CYP2D6 genindeki bu yaygın varyasyon Glu'nun Gly'ya değişimi ile sonuçlanır ve azalmış CYP2D6 aktivitesi ile ilişkilidir (Daly ve ark., 1994). Bu genin polimorfizmi, mRNA'da bir çerçeve kaymasına neden olur ve bir erken durdurma kodonu oluşturur, bu da debriskuin 4-hidroksilazın daha zayıf bir metabolizmasına yol açmaktadır (Hanioka ve ark., 1990).

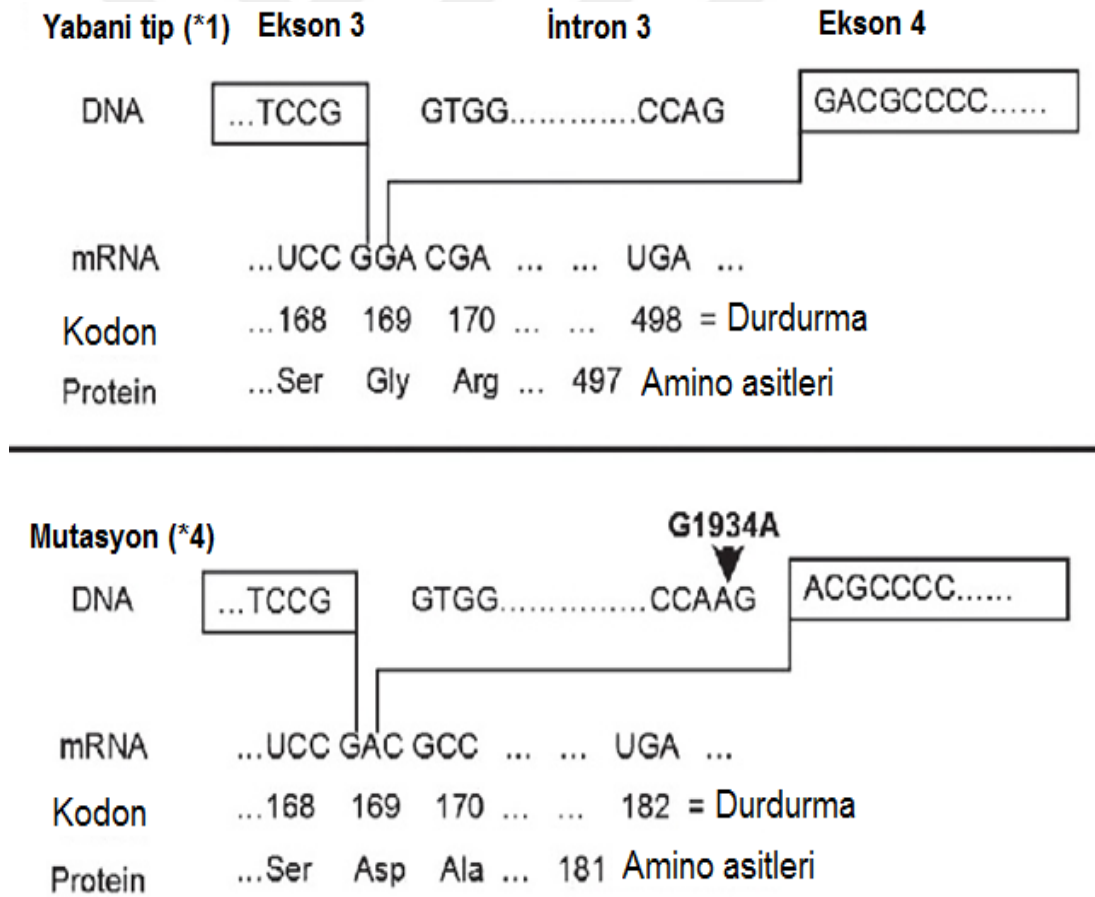
Sitokrom P450 2D6*4 (CYP2D6*4) terimi şu şekilde açıklanmaktadır: Sito mikrozomal veziküller, krom renklenmiş, P pigmentli, 450 spektrofotometrik absorpsiyon zirvesi 450 nanometre, 2 aile, D alt aile, 6 iso enzim (polipeptid), 4 allel olarak temsil edilmektedir (Ortiz de Montellano,1995). Sitokrom P450 proteinleri, yüzdelik amino asit dizisi özdeşliği temelinde, ailelere ve alt ailelere uygun şekilde düzenlenir; Aynı ailede olmak için amino asit seviyesinde \geq % 40'lık bir özdeşlik gereklidir (Nelson ve ark., 1993; Nelson, 1998; Nebert ve ak, 1991), alt aile içinse \geq % 55 amino asit sekans özdeşliği gereklidir. şekil 1.7, sitokrom P450 enzim nomenklaturünün bir örneği olarak CYP2D6-4'ün isimlendirilmesini göstermektedir (Bertz ve Granneman, 1997; Evans ve Relling, 1999; Rendic ve Di Carlo, 1997).



şekil 1.7. Sitokrom P450 enzim nomenklaturünün bir örneği olarak CYP2D6*4'ün isimlendirilmesi.

CYP2D6 * 4 alleli, beyaz ırk oldukça yaygın olan ve fonksiyonel olmayan bir aleldir. CYP 2D6 geninin beyaz Avrupa popülasyonunda, en yaygın değişimi intron 3 ve ekzon 4 arasındaki G1934A dir (alel*4), ve bunun varlığı yanlış mRNA yapışmasına neden olur, bu da okuma çerçevesinin değişmesine, translasyonun sonlandırılmasına ve enzimatik aktivitesi bulunmayan kusurlu protein ürününün oluşmasına neden olmaktadır (şekil 1.8) (Sachse ve ark.,1997). G → A süstitüsyonu, CYP 2D6 lokusunda birincil bir defekt olarak tanımlanır ve ZM'lerin mutant alellerinin % 80-90'ında mevcut olduğu tahmin edilmektedir (Gough ve ark.,

1990). Allel*4'ün azalmış CYP 2D6 aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Beyaz Avrupa nüfusunun yaklaşık% 5-10'unda, CYP 2D6 geninin her iki alelinde mutasyon tespit edilmiştir — genotip*4/*4 ZM ile ilgilidir. Sadece bir allel * 4'ün (heterozigot durum) taşıyıcıları, CYP 2D6 substratlarının OM'üdür — genotip *1/*4 (Levkovich ve ark., 2011; Sachse ve ark., 1997). Gaedigk ve arkadaşları, 100C> T ve 4180G> C TNP'leri olmayan bir CYP2D6 * 4 alelini tanımlamışlardır. 4180G> C polimorfizmi, CYP2D6 * 4J hariç tüm tanımlanmış CYP2D6 * 4 allellerinde mevcut olduğu belirlenmiştir. Denek, heterozigot 100C> T genotipi göstermiş olan bir CYP2D6*4/*4 ZM'dir. Ayrıca, beş yeniden düzenlenmiş CYP2D6 * 4 alleli üzerinde bulunan diğer dört TNP de bulunmamaktadır. Bu allel, insan sitokrom P450 allel adlandırma komitesi tarafından CYP2D6 * 4M olarak adlandırılmıştır (CommitteeGaedigk ve ark., 2006).



Şekil 1.8. CYP2D6 geninin intron 3'teki G1934A polimorfizmi.

CYP2D6 * 4, beyaz ırkta gözlenen ZM'lerin çoğuna katkıda bulunan fonksiyonel olmayan bir aleldir (Ingelman-Sundberg, 2004). Çinliler (Liou ve ark., 2006; Cai ve ark., 2006; Garcia Barcelo ve ark., 2000), Koreliler (Lee ve ark., 2006), Malezyalılar (Teh ve ark., 2001) ve Japonlarda (Kubota ve ark., 2000; Nishida ve ark., 2000), CYP2D6*4 neredeyse her zaman çok düşük frekanslardadır, yaklaşık % 0-2.8 oranında bulunmaktadır. Afrika kökenli Amerikalılarda CYP2D6*4 frekansı % 7.6(Cai ve ark., 2006), 264 Meksikalı Amerikalılarda % 10.0(Luo ve ark., 2005), 243 Meksikalı Mestizo popülasyonunda % 11.1 (Lopez ve ark.,2005) ve 103 Afro-Trinidadian'lılarda% 1.9 görünmektedir (Montane Jaime ve ark., 2103). Ruslar, Almanya, İtalya, İsveç ve Polonya gibi diğer Beyaz ırklılara benzer şekilde % 18.1'lik bir frekansa sahiptir (Sachse ve ark., 1997; Niewinski ve ark., 2002; Scordo ve ark., 2004). Faroe Adaları popülasyonunun frekansı diğer Beyaz ırklılara göre biraz daha yüksektir, yani % 33.3 oranındadır (Halling ve ark., 2005). Güney Hintliler ve Malezyalı Hintlilerde, frekanslar sırasıyla% 7,3 ve% 8.0, diğer Asyalılardan daha yüksektir, ancak Beyaz ırklılarda gözlemlenenenden daha düşüktür ve bu da Hint popülasyonlarının ayrı bir genetik bileşimini göstermektedir (Ismail ve Teh, 2001; Naveen ve ark., 2006).

CYP2D6 * 4 aleli (yani rs3892097) araştırmacılar tarafından yıllar boyunca hem olumlu hem de olumsuz olmak üzere birçok potansiyel sonuca sahip olduğu varsayılmıştır. Pozitif tarafta: Bu alel, mesane ve akciğer kanseri gibi belirli kanser riskini azaltabilir (Gough ve ark., 1990) ve Alzheimer hastalığında nörodejenerasyonun daha hafif olmasıyla ilişkili olabilir (Chen ve ark., 1995). Öte yandan, en az iki çalışma, Parkinson hastalığının pestisitlere maruz kalması üzerine gelişme riskinin CYP2D6 * 4 allellerinin taşıyıcıları arasında 3 ila 8 kat arttığı sonucuna varmıştır. CYP2D6 * 4 taşıyıcılarının riski pestisitlere maruz kalma derecesi ile orantılı görünmektedir ve pestisit maruziyetinin olmadığı CYP2D6 * 4 taşıyıcıları için Parkinson hastalığına yakalanma ek risk görünmemektedir ve pestisitlere sık sık maruz kalan CYP2D6 * 4 taşıyıcıları en yüksek Parkinson hastalığı riskine sahip olmaktadır (Elbaz ve ark., 2004; Deng ve ark., 2004).

Trisiklik antidepresanlarla (TSA) reçete edilen ve CYP2D6 * 4 aleli için homozigot olan hastalar bu ilaçları daha yavaş metabolize ederler, bu da onları yan etkilere karşı daha fazla riske sokar.1100 Hollanda hastası üzerinde yapılan bir

çalışmada, (1) CYP2D6 * 4 homozigotları için antidepresanların değiştirilmesinde 6 kat daha fazla yan etki olduğu (2) CYP2D6 * 4 homozigotlarının antidepresanların etkili ve idame dozlarının, bir veya daha fazla yüksek metabolize edici CYP2D6 allelinden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Bijl ve ark., 2008). rs3892097 (A; A), metoprolol gibi bir beta bloker ilacı alan hastalar, Rotterdam Çalışmasında 1.533 hastanın bir araştırmasına dayanarak, bradikardi için artmış risk altındadır. Bu CYP2D6 * 4 / * 4 homozigotlar ZM fenotiplerine sahiptir ve * 1 / * 1 NM'ler kıyasla 8.5 atım / dk düşük olan kalp hızlarında ayarlamışlardır (p <0.001), ZM'lerde bradikardi riskinin artmasına yol açmaktadırlar (olasılık oranı 3.86, CI: 1.68-8.86, p = 0.0014) (Bijl ve ark., 2008).

CYP2D6 genetik polimorfizmleri, substratlarının toksisitesini etkileme potansiyeline sahiptir. Zayıf da olsun veya normal / ultra hızlı CYP2D6 metabolizörler de olsun, amfetaminlerin, opioid analjeziklerin ve antidepresanların toksik etkilerine maruz kalabilirler. CYP2D6 ZM'leri genellikle ters etkilere daha yatkındır. Bunlar arasında en yüksek kanıt düzeyine sahip dört ilaç, amitriptilin, nortriptilin, venlafaksin ve fluoksetin'dir (Haufroid and Hantson, 2015). Klinik Farmakogenetik Uygulama Konsorsiyumu tarafından yapılan son bir değerlendirmede, trisiklik antidepresanlar amitriptilin ve nortriptilin için dozlama kılavuzları önerilmiştir. Bu kılavuzların yazarlarına göre, CYP2D6'da artmış trisiklik plazma konsantrasyonları nedeniyle ZM'lerde yan etkiler daha olası olduğundan alternatif ilaçlar tercih edilmelidir. Bir trisiklik garanti edilirse, yazarlar terapötik ilaç izleme ile kombine olağan dozun% 50 azaltılmasını önermişlerdir (Hicks ve ark., 2013).

Diğer trisiklik antidepresanlar arasında, defektif bir CYP2D6 genotipi ile ilişkili ölümcül doksepin zehirlenmesi yayınlanmıştır. CYP2D6 substratlarıyla ilişkili ölümcül ilaç zehirlenmelerinin postmortem toksikoloji vakalarını araştırırken, Koski ve ark. CYP2D6 * 3 / * 4 genotipli (ZM) bir hastada ölümcül ve görünüşte kazara doksepin zehirlenmesi olgusunu bulmuşlardır. Bu durumda doksepin ve nordoksepin (CYP2C19 aracılı N-demetilasyon ile üretilen aktif metabolit) konsantrasyonları sırasıyla 2.4 ve 2.9 mg / L (doksepin noroksepin için önerilen tedavi aralığı: 50-150 µg / L) ve doksepin / nordoksepin oranı 0.83'tür. Bu, aynı yılda analiz edilen nordoksepin-pozitif postmortemlerinin 35 vakası arasında en düşük bulunmuştur.

Doksepin ve nordosedin normal olarak CYP2D6 ile daha az aktif metabolitlere daha fazla metabolize olduğundan ve bu durumda yüksek nordoksepin konsantrasyonunun bu vakada akut zehirlenme ile tutarlı olmadığı düşünülürse (hasta CYP2C19 kapsamlı metabolizörü), CYP2D6 defektif genotipin ölüme önemli ölçüde katkıda bulunduğu ve tekrarlanan yüksek dozda doksepin içerebileceği sonucuna varılmıştır (Koski ve ark., 2007).

14 yaşında bir kız, kafein ve parasetamol (asetaminofen) ile birlikte 60 mg kodein aldıktan sonra nalokson tedavisi ile nörolojik semptomları düzeltilmiştir. Bu durumda, hastanın bir CYP2D6 ZM olmasını sağlayan bir * 4 / * 5 genotipi vardır, ancak maalesef morfin serum konsantrasyonu belirlenmemiştir. Aslında, bu hasta Angelman sendromu (gamma-aminobütirik asit [GABA] sistemi bozukluğunu içeren) hastasıdır ve yazarlara göre, gözlemlenen terapötik etki, naloksonun GABA reseptörlerine karşı zayıf antagonist etkisi ile ilişkili bulunmuştur (Shaw ve ark., 2012).

Ancak, Smith ve ark., amitriptilin doz aşımı olan 55 yaşındaki Beyaz ırklı bir kadında klinik seyri ve toplam trisiklik antidepresan konsantrasyonlarını (Amitriptilin Nortriptilin, immünoassay ile ölçülen) bildirmişlerdir. Yazarlar, amitriptilin nortriptilin konsantrasyonundaki (7. güne kadar yükselen konsantrasyonlar) sürekli artışın ve uzun süreli komanın (12. güne kadar) bozulmuş metabolizmayı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Hasta, CYP2D6 * 4 / * 4 genotipi olan bir CYP2D6 ZM olarak tanımlanmıştır (Smith ve Curry, 2011).

Prospektif klinik çalışmalar mümkün olmadığından, potansiyel toksik nortriptilin konsantrasyonları ile ilişkili olan CYP2D6 aktivitesinin (ve CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19) önemi popülasyona dayalı bir farmakokinetik yaklaşım (Simcyp simülatörü) kullanılarak araştırılmıştır. Nortriptilin 100 mg'lık bir günlük dozu alan bir sanal popülasyonda, kaza sonucu zehirlenme, yavaş metabolizma nedeniyle, potansiyel olarak toksik konsantrasyonlara yol açabilen normal bir günlük dozun alımı olarak tanımlanmıştır. İncelenen faktörler arasında, simülasyonlar CYP2D6 ZM statüye sahip olmanın yüksek konsantrasyonlara ulaşmadaki önemli bir risk faktörü olduğunu ve bu nedenle muhtemelen nortriptilin tarafından zehirlenebileceğini göstermiştir. Yazarların tahminlerine göre, CYP2D6 zayıf metabolize edici deneklerin% 16'sı, toksik sınırı aşan plazma konsantrasyonlarına

ulaşabilirler. Bununla birlikte, CYP2D6 ZM statüsü ve ortalama karaciğer CYP3A4 ekspresyonunun% 10'unun kombinasyonuna sahip bireyler %90 oranında zehirlenme riskine sahiptir. Bu nedenle, sonuçlar düşük CYP3A4 aktivitesi ve CYP2D6 ZM statüsünün kombinasyonunun toksik nortriptilin konsantrasyonlarının elde edilmesi için çok önemli olduğunu göstermektedir (Jornil ve ark., 2011).

CYP2D6 ZM'lerinin venlafaksin yan etkilerine karşı daha duyarlı olabileceği önerilmiştir. CYP2D6 aktivitesi için fenotiplendirilmiş 14 sağlıklı gönüllüde venlafaksin oral atılım oranları, (8 NM ve 6 ZM olarak sınıflandırılır), ZM'lerde NM'lere karşılaştırıldığında 4 kattan daha az olmuştur ve bu venlafaksin kaynaklı kardiyotoksisiteyi açıklamak için bir farmakogenetik mekanizmayı vurgulamaktadır (Lessard ve ark., 1999). Langford ve ark., 33 yaşında, 3g venlafaksin alan ve uzun süreli bir eliminasyon yarı ömrüne sahip olan bir beyaz ırklı kadın olgusunu bildirmişlerdir, bu da muhtemelen CYP2D6 ZM durumundan dolayı 15.3 saat (5 saat yerine) olarak tahmin edilmiştir (Langford ve ark., 2002).

Shams ve arkadaşları, CYP2D6 ZM'lerinde venlafaksin, özellikle mide bulantısı, kusma ve ishal gibi gastrointestinal yan etkilerin daha sık olduğunu göstermiştir. Venlafaksin ile tedavi edilen 100 hastada, bu araştırmacılar CYP2D6 aktivitesi indeksi olarak, plazma venlafaksin, O-desmetilvenlafaksin ve N-desmetilvenlafaksin konsantrasyonlarını ve O-desmetilvenlafaksin / venlafaksin oranını ölçmüştür. Ortalama O-desmetilvenlafaksin / venlafaksin oranını, sırayla 10. ve 90. Yüzdelerin 0.3 ve 5.2 olmasıyla 1.8 olarak belirlemişlerdir. O-desmetilvenlafaksin / venlafaksin oranı 0.3'ün altında olan bireylerin hepsi, * 6 / * 4 (n 1), * 5 / * 4 (n 2) veya * 6 / * 6 (n 1) genotipleri ile ZM'ler, 5.2'in üzerindeki oranlarda olan bireylerin hepsi UM'lerdir (n 6, gen kopyaları) olarak tanımlanmıştır. Klinik sonuç ölçümleri O-desmetilvenlafaksin / venlafaksin oranının 0.3'ün altında olan hastaların diğer hastalarla karşılaştırıldığında daha çok gastrointestinal yan etkilere (p = 0,005) sahip olduğunu ortaya koymuştur (Shamsve ark., 2006). Bu araştırmacıların sonuçlarına göre, noradrenalin ve dopaminin geri alım inhibisyonundaki hafif farklılıklar, ana bileşik için metabolitlerden daha belirgin olup, yan etkilerin yüksek sıklığını açıklayabilmektedir. Tabii ki, genetik faktörlerin yanı sıra, venlafaksin toksisitesi hakkında çalışırken ilaç etkileşimi de dikkate alınmalıdır.

Ölümcül bir ilaç zehirlenmesinde, ölen kişi ilacını düzenli olarak (günde iki kez 150 mg venlafaksin dahil) almıştır (Jornil ve ark., 2013), ve vaka ya da otopsi bulgularında hiçbir şey intihara işaret etmemiştir, toksikolojik değerlendirme ölüm sebebinin venlafaksin, oksikodon ve etanolün bir kombinasyonu nedeniyle medyana gelen kaza sonucu zehirlenme olduğunu belirlemiştir. Venlafaksin kan konsantrasyonunun yüksek olduğu, fakat O-desmetilvenlafaksin / venlafaksin oranının, istisnai derecede düşük (0.006) olup daha önce bildirilenlerden 10 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Kingback ve ark., 2012). Bunları daha fazla araştırmak için, Jornil ve ark., düşük metabolit oranının, CYP2D6 ve CYP2C19'un ZM durumunun bir kombinasyonunun sonucu olduğunu gösteren bir mekanik farmakokinetik simülasyon gerçekleştirmiştir. Onların hipotezi, hasta CYP2D6*4 / *5 (ZM) ve CYP2C19*2 / *2 (CYP2C19 * 2 fonksiyon kaybı alleli olduğundan, aynı zamanda ZM olarak bulunduğu için, genetik analizle doğrulanmıştır (Jornil ve ark., 2013). Olgu sunumu, simülasyon sonuçları ve daha önce yayınlanmış sonuçlara dayanarak yazarlar (McAlpine ve ark 2011; Lessard ve ark., 1999; Shams ve ark., 2006), potansiyel olarak toksik konsantrasyonların terapötik dozlarda bile ulaşılmadığından emin olmak için eksik veya düşük kombine CYP2D6 ve CYP2C19 aktivitesi olan bireyler üzerinde terapötik ilaç izlemenin yapılmasının tavsiye edilebileceği sonucuna varmışlardır (Jornil ve ark., 2013).

Selektif serotonin geri alım inhibitörleri veya SSRI'lar günümüzde en yaygın olarak reçete edilen antidepresanlar sınıfını temsil etmektedir. Fluoksetin, esas olarak CYP2C19, CYP2D6 ve CYP3A4 / 5 tarafından aktif bir demetillenmiş metabolit, norfluoksetin'e metabolize edilir. Hem fluoksetin hem de norfluoksetin, çok güçlü CYP2D6 inhibitörleri olarak bilinir ve muhtemelen CYP2D6 tarafından daha az aktif metabolitlere biyotransforme edilir. 9 yaşındaki bir çocuğa ait ölümcül bir zehirlenme vakasında, tamamen defektif bir CYP2D6 genotipi (ZM) ile birlikte olağan dışı bir şekilde düşük fluoksetin ile norfluoksetin oranı bulunmuştur. Bu çocuk dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, obsesif kompulsif bozukluk ve Tourette sendromundan muzdariptir ve fluoksetin, metilfenidat ve klonidin kombinasyonu ile tedavi edilmiştir. Tedavisi sırasında, çocuk status epileptikusa girdikten sonra kardiyak arrest ve ölümlü sonuçlanmıştır. Otopside, fluoksetin ve norfluoksetin kan, beyin ve diğer doku konsantrasyonları beklenenden birkaç kat

daha fazla olmuştur. Adli Tıp Uzmanı raporu, ölüm vakası olarak fluoksetin toksisitesini sunmuştur ve çocuğun evlat edinen ebeveynleri ilaç erişimini kontrol ettikleri için, cinayete teşebbüs şüphesiyle sosyal yardım kurumları tarafından araştırılmıştır. Otopsi dokusunun daha fazla genetik testi, CYP2D6 için ZM fenotipine neden olan iki mutant allelin (ayrıntılı değil) varlığını ortaya koymuştur ve bu ve diğer kanıtların bir sonucu olarak, evlat edinen ebeveynlerin araştırması sonlandırılmıştır (Sallee ve ark., 2000). Yazarlara göre, bu, ilaç metabolizmasının bozukluğu ile sonuçlanan CYP2D6 genetik polimorfizmine sahip bir çocukta fluoksetin ile ilişkili ölümün ilk raporu olmuştur.

1.4. Tek Nükleotid Polimorfizm Analizleri İçin Genotipik Analiz Yöntemleri

Yukarıda verilen örneklerden anlaşılacağı gibi ilaçla tedavide zehirlenme veya ölüm vakalarında olayın aydınlatılmasında genetik farklılıkların oldukça önemi bulunmaktadır. Bu bölümde bireyler arasındaki genetik farklılıkların analizleri hakkında bilgi verilmektedir.

Tek nükleotid polimorfizmleri (TNP'ler), bir popülasyonda doğal varyasyonu gösteren genomda bireysel baz pozisyonlarıdır. İnsanlarda en çok bulunan genetik çeşitliliği temsil ederler ve ilişkisiz bireyler arasındaki tüm farklılıkların % 90'ından fazlasını oluştururlar. TNP modeli, birçok insan fenotipini etkileyebilir. Bu nedenle, TNP genotiplemesine dayanan büyük ölçekli ilişki çalışmalarının, karmaşık hastalıklara ve ilaçlara veya çevresel kimyasallara verilen tepkileri etkileyen genleri belirlemesine yardımcı olması beklenmektedir. TNP'ler, hedef tanımlamadan klinik çalışmalara kadar, ilaç geliştirme sürecinin tüm aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır. TNP'lerin analizi ayrıca ilaç ve ilaç rejimlerinin farmakogenomiklerin temel prensibi olan belirli genotiplere uyarlanmasına yardımcı olabilmektedir (Twyman RM, 2005).

İdeal genotipleme metodu aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır: (a) analiz, sekans bilgisinden kolay ve hızlı bir şekilde geliştirilmelidir, (b) analiz geliştirmenin maliyeti, biyogöstergeye özgü reaktifler ve uzman personel tarafından optimizasyona harcanan zaman açısından düşük olmalıdır, c) reaksiyon doğru olmalıdır, böylece optimal olmayan DNA numuneleri bile güvenilir sonuçlar üretebilir; (d) analiz

kolayca otomatikleştirilmeli ve minimum düzeyde el yordamı gerektirmelidir; (e) veri analizi, otomatik, doğru genotip çağrısı ile basit olmalıdır; (f) reaksiyon formatı esnek ve ölçeklenebilir olmalı, günde birkaç yüzden milyona kadar analiz gerçekleştirebilmelidir; ve (g) optimize edildikten sonra, genotip başına toplam test maliyeti (ekipman, reaktifler ve personel dahil) düşük olmalıdır (Kwok, 2001).

Maalesef bugüne kadar böyle bir ideal genotipleme yöntemi mevcut değildir. Daha gerçekçi bir TNP genotipleme yönteminin geliştirilmesinden önce, biyokimyasal, mühendislik ve analitik yazılımlarda daha fazla gelişme sağlanmalıdır. Son 20 yılda, PZR ile genomik bölgenin çoğaltılmasından sonra PZR ile TNP genotiplendirmesi için, melezleme (Iwasaki ve ark., 2002), alel-spesifik PZR (Papp ve ark., 2003), primer uzatma (O'Meara ve ark.,2002), oligonükleotid ligasyonu (Pickering ve ark., 2002), doğrudan DNA dizilimi (Chatterjee ve ark., 1999) ve endonükleaz bölünmesi gibi bir çok farklı yöntem geliştirilmiştir (Deng, 1988; Ota ve ark., 1991). TNP genotiplendirmesi için meydana gelen yeni teknolojilerden Taqman yöntemi (Livak ve ark.,1995; Livak, 1999), Invader yöntemi (Kwiatkowski ve ark., 1999; Fors ve ark., 2000), MALDI-TOF yöntemi (Haff ve ark., 1997), GeneChips (Gunderson ve ark., 2005) gibiler olup, bunlar yüksek üretim potansiyeline sahiptir, ancak pahalı ekipmanların satın alınmasını gerektirir.

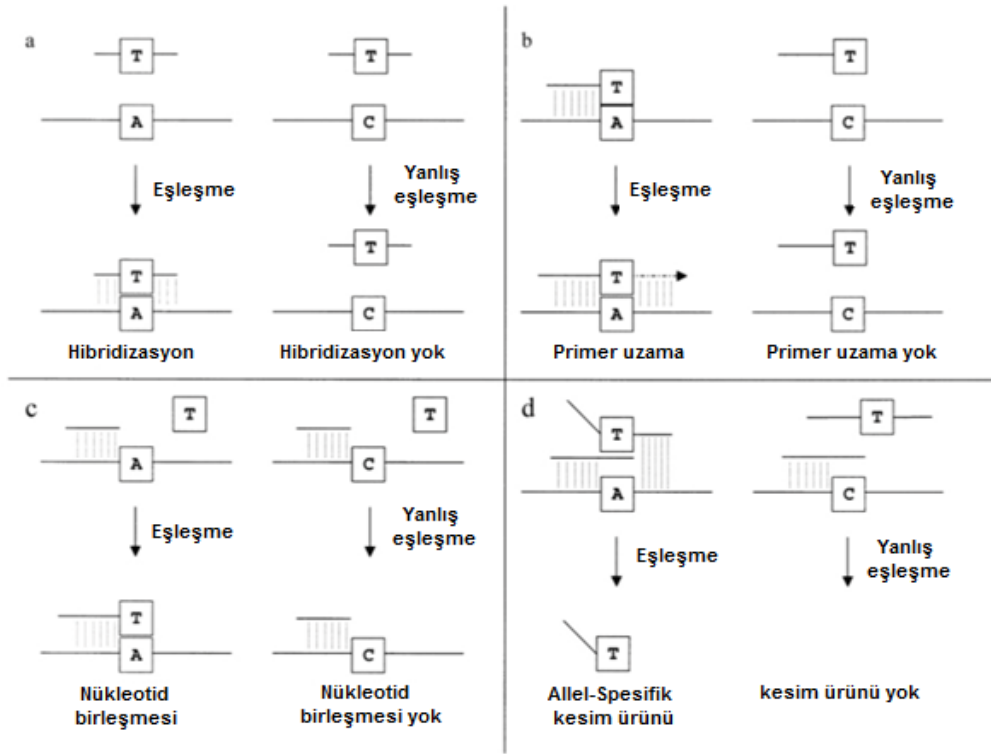
TNP genotipleme teknolojileri, belirli bir TNP lokusunda mevcut olan baz tipini belirleme yöntemi (alel tanımlaması) ve alel (ler) in varlığını bildirme yöntemi (sinyal tespiti) olarak iki yöntem içermektedir. Melezleme, primer uzatma, oligonükleotid ligasyonu ve enzim kesim genel olan alel tanımlama yöntemleridir. Birçok sinyal tespit platformu vardır ve bunların çoğu gerçek zamanla ya da analiz son noktasında etiketi takip etmektedir. Benzersiz bir şekilde, kütle spektrometrisi, alternatif bir baz içeren DNA moleküllerinin kütlelerini ayırt ederek, bir etikete ihtiyaç duymadan bir tanımlama deneyinin alel-spesifik ürününü tespit etmek için kullanılabilir (Kwok, 2001; Syvanen, 2001; Twyman, 2005; Twyman ve Primrose, 2003;)

TNP'ler diziye özgü / sekans-spesifik veya diziye özgü olmayan / sekans-spesifik olmayan bir şekilde tespit edilebilir. Diziye özgü olmayan saptama, elektroforez sırasında yakalanma, bölünme veya hareketlilik değişikliğine veya denatüre olmayan koşullar altında biraz farklı konformasyonlar üstlenen allelik DNA

molekülleri veya tek iplikli DNA molekülleri arasında oluşan eşleşmeyen heteroduplekslerin sıvı kromatografisine dayanmaktadır. Polimorfizmlerin Diziyeye özgü olmayan saptanması polimorfizm/mutasyon keşfinin temelini oluştursa da, genotiplenme için kabul edilebilir bir yaklaşım değildir, çünkü intersgenotiplenmenin gerçek genotip olup olmadığı kesin değildir (Kwok and Chen, 1998). Diziyeye özgü saptama, alel tanımlamasına yönelik dört yaygın mekanizmaya dayanır: alele özgü melezleme, alele özgü tek-bazlı primer uzatma, ve alele özgü oligonükleotid ligasyonu ve alele özgü invaziv bölünme (Kwok, 2000). Dört mekanizmanın tümü güvenilirdir, ancak her birinin avantajları ve dezavantajları vardır.

1.4.1. Alele Özgü Hibridizasyon

Bir TNP lokusundaki aleller arasında tanımlama yapmak için kullanılan en basit yöntem, alel spesifik oligonükleotid (ASO) probu kullanılarak melezlemedir. İki prob gereklidir - her bir alel için spesifik olanı ve eşleşmeyen problemlerin melezleşmesini önlemek için tek baz yanlış eşleşme [single-base mismatch] yeterli olacak şekilde sıkı koşullar kullanılmaktadır (Şekil 1.9). ASO problemleri, etiketli ya da etiketlenmemiş çiftler olarak kullanılabilir, bu durumda, her bir TNP'nin genotiplenmesi için, prob 1'in etiketlendiği ve prob 2'nin etiketlenmediği ve bu rollerin tersine çevrildiği iki ayrı deney gerekmektedir. Alternatif olarak ve tercihen yüksek verimli analizler için, her bir prob için farklı etiketler kullanılabilir, böylece her TNP tek bir reaksiyonda genotiplenebilir. TaqMan gibi daha sofistike deneyler, birincil tanımlama reaksiyonu olarak alel spesifik melezlemeyi kullanır, fakat sinyal tespiti için ek enzimatik adımlar gerektirmektedir. Alel-spesifik PZR, alel spesifik melezlemenin bir modifikasyonu olup, burada tanımlama bir insanın doğrudan tespiti yerine alele özgü primer yapıştırma [annealing] (ardından PZR amplifikasyonu) ile yapılmaktadır (Şekil 9b). Değişken baz konumunun primerlerden birinin ortasında yer aldığı bir strateji kullanılabilmesine rağmen, ASO tekniğine doğrudan benzerdir, ancak sıkı koşullar optimize edilmediğinde, [mismatched primer] yanlış eşleşmiş primerin uzamasına izin verilir. Daha hassas bir yaklaşım, primerlerden birinin 3'ünün ucunu değişken taban pozisyonuna yerleştirmektir çünkü uzatma, primerin 3'ucundamükemmel tamamlayıcılığa bağlıdır (Newton ve ark., 1980; Twyman, 2005).



Şekil 1.9. Alel tanımlama yöntemlerinin prensipleri. (a) Alele özgü melezleme. (b) Alele özgü PZR. (c) Alele özgü tek baz primer uzatma. (d) Alele özgü invaziv bölünme. Her durumda, TNP pozisyonu ve probdaki değişken baz pozisyonu gösterilmektedir (Twyman, 2005).

1.4.2. Alel-Spesifik Ligasyonu

DNA ligazları, DNA moleküllerinde boşlukları tamir etmede oldukça spesifiktir. İki bitişik oligonükleotid bir DNA şablonuna yapıştığında, bunlar sadece oligonükleotidler birleşme noktasındaki şablona mükemmel şekilde uyuyorsa birlikte bağlanırlar (Barany,1991). Oligonükleotidlerden biri, iki allele özgü varyantlara sahiptir ve tanımlayıcı baz 3' konumunda bulunur. Allele özgü oligonükleotid (ASO) ve şablon arasında mükemmel tamamlayıcılık varsa, ortak oligonükleotide başarıyla bağlanır. Eğer değilse, ligasyon başarısız olur ve iki oligonükleotid ayrı kalır. Ligasyon en yüksek spesifite seviyesine sahip olmakla birlikte, allelik tanımlama mekanizmaları arasında en iyi duruma getirilmesi en kolay olanıdır, ancak en yavaş reaksiyon budur ve en fazla sayıda modifiye prob gerektirmektedir. Analizin kendi içinde çok hassas değildir, ancak ligaz zincir reaksiyonu veya yuvarlanma çember büyütme teknolojisi (RCAT, Yaklaşık 80 nükleotid uzunluğundaki iki ASOs, şablonda bir daire oluşturmak için, bağlandığında kapalı bir döngü veya asma kilit

probu üretecek şekilde tasarlanmıştır) gibi ek adımlar kullanılarak duyarlılık artırılabilir. Bu daireye bağlanan primerler bir iplikçik değiştirici DNA polimerazı ile genişletilebilir, böylece yeni iplikçik daireyi tamamladığında ve kendisiyle karşılaştığı zaman, sürekli olarak yer değiştirir, floresan yöntemlerini kullanarak tespit edilmesi kolay olan uzun bir konkatemer üretilir (Lizardi ve ark., 1998).

1.4.3. Alel Spesifik Tek-Bazlı Primer Uzatma

Alel-spesifik tek-bazlı uzatmada (aynı zamanda mini sekans olarak da adlandırılır), polimorfik bölgenin yukarıdaki bir nükleotidi bağlayan primerler tasarlanır ve alel tanımlama, mükemmel bir şekilde yapılmış primerin uzama kabiliyetine bağlıdır (Şekil 9c) (Syvanen, 1999). Bu, allel-spesifik PZR'den farklıdır, burada tanıma pozisyonu, primerlerden bir tanesi içindedir ve uzantı, primerin şablonuna yapışma yeteneğine bağlıdır. Alel-spesifik primer uzatma yöntemleri hibridizasyon / yapıştırma denemelerine göre daha uyarlanabilir, çünkü çok daha fazla çeşitlilikte etiketleme stratejileri kullanılabilir. Örneğin, çözelti içindeki serbest nükleotitler, dört farklı floresan etiketi, kütle etiketi veya hapten ile etiketlenebilir ve aynı karışımın çoklu TNP'lerin paralel olarak (örn., Bir mikrodizi üzerinde) saptanmasında kullanılmasına izin verilir. Genotipleme için primer uzatma yöntemleri Genetik Bit Analiz™ (GBA) teknolojisi olarak geniş ölçüde patentlenmiştir ve birçok popüler ticari genotipleme sisteminin (örn., SnaPshot) temelini oluşturmuştur (Twyman, 2005).

1.4.4. Alel-Spesifik Enzimatik Kesim

Yapıya özgü enzimler, üst üste binen oligonükleotid problemlerin melezleşmesiyle oluşan kompleksleri ayırırlar. Polimorfik alanın üst üste geldiği noktada olacak şekilde tasarlandığında, doğru üst üste binen yapı, tek-baz uyumsuzluğu/yanlış eşleşme olan proba değil, sadece alel spesifik problemler tarafından oluşturulur. Yüksek sıcaklık ve alel spesifik probun fazlalığı, izotermal bir reaksiyonda bulunan her bir hedef dizi için çoklu problemleri bölebilir. Bu yöntemin yenilikçi bir uygulamasında,

bölünmüş alel-spesifik problar, etiketli bir ikincil probun ayrıldığı ikinci bir reaksiyonda kullanılır. Bu sinyal amplifikasyon aşaması, PZR gibi bir hedef amplifikasyon işlemine gerek kalmaksızın tespit için, üretilen etiketlenmiş bölünme ürün miktarının saatte hedef dizi başına 106–107 ye kadar artırılmasına yardımcı olmaktadır (Hall ve ark., 2000).

Bu yöntemin ana avantajları, reaksiyonun izotermal özelliği ve PZR amplifikasyonu olmaksızın genotipleme potansiyelidir. Daha iyileştirmeye ihtiyaç duyan bazı teknik sorunlar mevcuttur. İlk olarak, reaksiyon için gerekli olan genomik DNA miktarı yüksektir. İkincisi, marker-spesifik probun saflığı çok yüksek olmalıdır. Üçüncü olarak, prob tasarımı biraz zor, çünkü sürekli reaksiyonlar aynı koşullar altında çalışmalıdır, ancak TNP'lerin dizi içeriği sabittir. Prob tasarım algoritmasının daha da geliştirilmesiyle bu teknik problemlerin üstesinden gelinebilir (Kwok, 2001).

1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (PZR-RPUP) Analizi

PZR-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizm (RPUP) analizi genotipleme için popüler bir tekniktir. PZR-RPUP, PZR ile çoğaltılmış DNA'nın endonükleaz ile muamelesini temel almaktadır. Spesifik restriksiyon enzimleri, PZR ürününün nokta mutasyon bölgesinde DNA'yı tanır ve burdan keserler. TNP tipleri, endonükleaz kesiminden kaynaklanan daha küçük DNA parçalarının boyutunu doğrulamak ve ayırmak için jel elektroforezi kullanılarak kolayca tanımlanabilir. PZR-RPUP basit, hassas ve güvenilir bir yöntemdir ve enstrümantasyona minimum yatırım gerektirir. Bu protokolün sınırlamaları, hedef TNP dizilerinin ticari restriksiyon enzimleri için uygun olmadığı ve tersine, dizilerin tek bir restriksiyon enzimi için çok fazla tanıma noktalarına sahip olduğu durumlardadır (Abbud ve ark.,1998; Simsek ve ark., 2002; Bu ve ark., 2007). Bu yöntem sadece bir TNP'nin genotiplenmesi için değil, aynı zamanda ekleme / çıkma polimorfizmleri ve çoklu TNP gruplarından oluşan insan lökosit antijeni alelleri (HLA) gibi çoklu mutasyonlar için kullanılabilir (Ota ve ark., 1992). ABO kan grubu polimorfizmi, insanlarda gözlenen ve analiz edilen ilk moleküler polimorfizmdir. Bu kırmızı kan hücresinin antijenik varyasyonu, PZR-

RPUP yöntemiyle ABO genotipleri olarak tanımlanabilen A, B ve O allellerini üreten birkaç DNA tek-bazlı ikamesinden kaynaklanmaktadır (Lee ve Chang, 1992).

PZR-RPUP teknolojisinin temel avantajları ucuzluk ve gelişmiş enstrümanlara gerek duymamasıdır. Ek olarak, PZR-RPUP analizinin tasarımı genellikle kolaydır ve kamuya açık programlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Dezavantajlar arasında belirli endonükleazlara olan gereksinim ve birçok TNP'nin aynı restriksiyon enzim tanıma bölgesini etkilediği durumda kesin varyasyonları belirleme zorluğu yer alır. Ayrıca, PZR-RPUP bir elektroforetik ayırma basamağını içeren birkaç adımdan oluştuğundan, nispeten zaman alıcıdır. Son olarak, her bir TNP için spesifik primer çiftleri ve restriksiyon enzimleri ihtiyacından dolayı, bu teknik çok sayıda farklı TNP'nin eş zamanlı analizi için uygun değildir. Bu, yüksek verimli analizinin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Rasmussen, 2012).

PZR-RPUP, türe özgü varyasyonların genotiplenmesi için son derece değerli bir tekniktir. Faktör V Leiden ve protrombin G20210A'nın genotiplendirilmesi için en yaygın kullanılan referans standarttır (Emadi ve ark., 2010). Aynı zamanda, bir Kidd-null fenotipi ile ilişkili JK alelinin saptanması (Horn ve ark., 2012) ve apolipoprotein E (APOE) allellerinin belirlenmesi dahil olmak üzere çeşitli başka amaçlar için kullanılmıştır (Jiang ve ark., 2011). Tür içi varyasyonların belirlenmesi için değerli olmanın yanı sıra, PZR-RPUP tekniği tür tanımlama ve farklılaşma için çok popülerdir. Yakın zamana kadar, mikobakteriyel türlerin tanımlanması ve farklılaştırılması için tercih edilmiştir (Sankar ve ark., 2011). 12S rRNA geninde korunmuş bir bölgeyi hedefleyen primerlerin kullanılması, ardından restriksiyon enzim tedavisi ve elektroforetik ayırma ile yakından ilişkili kümes hayvanları türleri ayırt edilebilir (Saini ve ark., 2007). Benzer bir yaklaşım, karacalar, kara geyik ve kunduz gibi av hayvanlarını evcilleştirilen geviş getiren hayvanlardan ayırmak için kullanılmıştır. Tek bir restriksiyon enziminin kullanılması, PZR-RPUP ile tür farklılaşmasında yeterli olabilir (Fajardo ve ark., 2009). Ancak, çoğu zaman, yakından ilişkili türler arasında ayırt etme kabiliyeti, birden fazla restriksiyon enziminin uygulanmasını gerektirir (Rojas ve ark., 2009).

PZR-RPUP, primerler tasarlanması, uygun bir restriksiyon enziminin belirlenmesi, amplifikasyon, amplifiye ürünlerin restriksiyon enzim muamelesi ve restriksiyon fragmanlarını görmek için elektroforez dahil olmak üzere birkaç ayrı

adımdan oluşur (Rasmussen, 2012). Burada dikkat, primer tasarımı, uygun kesim enzimlerinin bulunması ve elektroforetik teknikler üzerine odaklanacaktır.

1.5.1. Primer Tasarımı ve RPUP Enzimlerinin Tanımlanması

PZR-RPUP daima bir optimum primer çiftinin tasarlanması ve PZR-amplifiye edilmiş üründeki TNP'leri tanımlayacak olan restriksiyon enzimlerinin bulunması ile başlar. Yüksek kaliteli sonuçlar elde etmek için, spesifik amplifikasyon primerleri tasarlamak ve restriksiyon enzimi veritabanından (REBASE) (<http://rebase.neb.com>) uygun bir restriksiyon enzimi seçmek önemlidir. TNP bölgesinde tanımlama restriksiyon siteleri (discriminative restriction sites) bulunursa doğal PZR-RPUP kullanılabilir; Aksi halde, yapay restriksiyon siteleri (yanlış eşleşmiş PZR-RPUP olarak bilinir) sağlamak için bitişik bölgelerde yanlış eşleşmiş bazlar uygulanır. Hedef TNP'nin mevcut restriksiyon enzimleri için herhangi bir bölünme bölgesi bulunmasa bile, yanlış eşleşmiş PZR-RPUP yönteminin kullanılması mümkündür (Love-Gregory ve ark., 2001). Bu yöntemde, TNP sitesine bitişik yapay restriksiyon siteleri (yanlış eşleşmiş) içeren primerler kullanılır. PZR primer setleri, ortolog olmayan spesifik olmayan bir bölge veya paralog (duplike) bir bölgeyi çoğaltmak için değil, belirli bir DNA bölgesini çoğaltmak için tasarlanmalıdır (Zhang, ve ark., 2005). Primerler ve restriksiyon enzimleri seçiminin entegre edildiği PZR-RPUP 'nin tasarımı için birkaç program bulunmaktadır (Çizelge 1.5). Bu tür programları kullanarak PZR-RPUP 'nin tasarımı önemli miktarda zaman tasarrufu sağlayabilir. Ayrıca, bu programlar, uygun restriksiyon enzimlerinin tanımlanmasında çok etkilidir ve çoğu, hem doğal PZR-RPUP hem de yanlış eşleşmiş PZR-RPUP, ayrıca primer giriş restriksiyon analizi (PIRA) veya zorlamalı PZR restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (F-PZR-RPUP) olarak da adlandırılmakta olup, için primer restriksiyon fragmanlarının tasarımına izin verir (Rasmussen, 2012).

Çizelge 1.5. PZR-RPUP'nın tasarımı için programlar.

Adı	Fonksiyonu	Referans
PIRA-PZR	Yanlış eşleşmiş PZR-RPUP için primerler tasarımı	Ke ve ark., 2001
TNPicker	Doğal ve yanlış eşleşmiş PZR-RPUP için primerler tasarımı	Niu ve Hu, 2004
TNP Cutter	Doğal ve yanlış eşleşmiş PZR-RPUP için primerler tasarımı	Zhang ve ark., 2005
TNP-RPUP ing	Doğal ve yanlış eşleşmiş PZR-RPUP için primerler tasarımı. Birden fazla TNP'li dizilere ek olarak bi-allelık, tri-allelık ve tetra-allelık TNP'leri kabul eder.	Chang ve ark., 2010
Prim-TNP ing	Doğal PZR-RPUP, yanlış eşleşmiş PZR-RPUP için primer tasarımı ve normal PZR dahil diğer amaçlar	Chang ve ark., 2009

1.5.2. Amplikonların Kesilmesi

Bir PZR-RPUP analizinin güvenilirliği, kullanılan restriksiyon enziminin tanıma dizisini içeren fragmanların tam kesilmesine bağlıdır. Kesim karışımının doğru hazırlandığını ve reaksiyon koşullarının uygun olup olmadığını değerlendirmek için, iç kesim kontrolünün kullanılması önerilir. Amplifiye edilmiş fragmanın bir RPUP göstergesinin genotipleme için kullanılan restriksiyon enziminin polimorfik olmayan bir tanıma bölgesini içermesi durumunda, bu site bir iç kesim kontrolü olarak hizmet edebilir (Griffioen ve ark., 2005; Szantai ve ark., 2006). Amplifiye edilmiş fragmanda bu tür polimorfik olmayan bir alan mevcut değilse, yanlış eşleşmiş bir primerin tasarımı ile kullanılmış RPUP enzimi için bir tanıma bölgesi yapay olarak yaratma olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, bu yaklaşım K-ras gen mutasyonlarının tanımlanması için bir PZR-RPUP analizinde kullanılmıştır (Mora ve ark., 1998). Alternatif olarak, sindirim reaksiyonu, ilgili restriksiyon enzim tanıma bölgesini içeren bir DNA fragmanı ile çoğaltılabilir ve amplikonunkilerden başka boyutlarda parçalar üretir (Lima-Neto ve ark., 2009). Plazmidler, bu tür iç sindirim kontrolü olarak kullanılmıştır ve yaygın olarak kullanılan restriksiyon enzimlerinin birçoğunun tanıma yerlerini içerdiklerinden bunlar için uygundur. Floresan etiketli primerler ile gerçekleştirilen PZR-RPUP için, başka bir flüoresan boya ile etiketlenmiş ve ilgili restriksiyon enzim tanıma

bölgesini içeren fragmanlar, iç sindirim kontrol fragmanı olarak kullanılabilir (Nielsen ve ark., 2007). Bazen, amplifiye edilmiş fragmanlar birkaç RPUP markeri içerir. Bu durumda aynı reaksiyon karışımında birden fazla restriksiyon enzimi ile aynı anda sindirim mümkündür (Szantai ve ark., 2006).

1.5.3. Elektroforetik Ayırma Ve Parçaların Görselleştirilmesi

Seçilen restriksiyon enzim (ler) ile amplikonların tamamlanmasından sonra, elde edilen parçalar elektroforez ile ayrılır. Sıklıkla, bu, poliakrilamid ya da moleküler eleme matrisi olarak agaroz ile slab jel elektroforezi kullanılarak yapılır. Son zamanlarda, kapiller elektroforez ve mikrokanal elektroforezi giderek daha popüler hale gelmiştir. Geleneksel slab jellerine göre daha yüksek çözme gücü ve verim sunmaktadır (Stellwagen ve ark., 2009; Sinville ve Soper, 2007).

Restriksiyon enzim ile işlenmiş amplikonların görselleştirilmesi, floresan etiketli amplifikasyon primerleri kullanılarak yapılabilir. Ancak, en yaygın PZR-RPUP analizleri etiketlenmemiş primerler ile gerçekleştirilir. Bu durumda, restriksiyon fragmanlarının görselleştirilmesi, elektroforez sırasında ("migratio") DNA parçalarının etidyum bromür veya başka bir floresan boya ile kompleksleştirilmesi ile gerçekleştirilir. Kovalent olarak etiketlenmiş primerler ile PZR-RPUP analizi için, restriksiyon-enzim ile işlenmiş parçalar genellikle ısıtılır ve mikrosatellitlerin genotiplenmesi için prosedürü benimseyen parça boyutlarını belirlemek için tek iplikçik halinde denatüre elektroforez ile analiz edilir. Bunun avantajı, boyut belirlemenin öncelikli olarak parça uzunluklarına bağlı olmasıdır. Tersine, denatüre edici olmayan koşullar altında elektroforez kullanan DNA fragmanlarının boyut tayini, DNA fragmanlarının konfigürasyonundan etkilenebilir (Nielsen ve ark., 2007; Rasmussen, 2012).

1.5.4. Tezin Amacı

Çeşitli ilaçlar ve kimyasal maddelerin neden olabileceği zararlı etkiler söz konusu etkenlerin vücuttan uzaklaştırılmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteleri ile ilişkilidir. Bu enzimlerden önemli bir üyesi Sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) proteindir. Bu enzimi kodlayan gendeki değişiklik enzim aktivitesini de değiştirmektedir. Belirtilen genin birçok antipsikotik ve antidepresan ilacın metabolizmasında rol alması yanında söz konusu bu tedaviyi alan kişilerde intihar riskinin daha fazla olması genin adli toksikoloji açısından önemini ortaya koymaktadır. İlave olarak CYP2D6 ile metabolize edilen ilaçlarla oluşabilecek muhtemel zehirlenmeler yanında yüksek doz ilaç kullanımına bağlı toksikasyon ve intihar vakaların değerlendirilmesinde genetik farklılığın belirlenmesi önemli veriler sunacaktır. Bazı adli vakalarda genetik farklılıkla ilişkili olan ve bir ilacın metabolite oranının belirlenmesinin, vakanın aydınlatılmasındaki yeri ve önemine vurgu yapmaktadır. Bu bilgiler temelinde burdaki tez çalışmamızda amaç CYP2D6 genindeki rs3892097 guaninden adenine olan farklılığın aydınlatılmasını sağlayacak bir genotipik analiz yönteminin laboratuvarımızda kurulması ve gerek adli toksikoloji vakalarında gerekse klinikte süreçlerde rutin analiz haline getirilmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Maddeler

100-1000 bç DNA ladder GeneRuler marker (Fermentas)
dNTP karışımı (Fermentas)
PZR Tampon (Fermentas)
Magnezyum (Fermentas)
Sentetik olgonükleotid (Fermentas)
Taq DNA Polimeraz (Qiagen)
İnsan genomik DNA (Promega, G3041)
Etilendiamin-tetraasetik asit (EDTA), (Merck)
Restriksiyon enzimi- *Mva* II
Trizma Base (Merck)
Etidyum Bromür (Appllichem)
Agaroz (Prona)
Borik asit (Merck)
Asetonitril (Sigma, HPLC grade)
Metanol (Sigma, HPLC grade)
Potasyumdihidrojenfosfat
Ultra saf su
Sodyum hidroksit (Merck)
Hidroklorik asit (Merck)

2.2. Kullanılan Cihazlar

pH metre (Mettler Toledo)
Terazi (Metler, Almanya)
Hassas terazi (Mettler Toledo 4 Digit)
Vorteks (Biosan)

Mikropipet seti (Ependorf, Thermo),
Jel Görüntüleme Sistemi (Syngene)
Termal Cycller (Techne Tc512)
Mini elektroforez tankı (Scie-Plas)
Midi elektroforez tankı (Thermo Scientific Easycast, EC)
Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad)
Mikrodalga Fırın (Arçelik)
Otoklav (Nüve)
- 80 0C Derin dondurucu (Thermo Scientific forma 88000 series)
- 20 0C Derin dondurucu (Beko)
Mini santrifüj (Heraeus)
Mikro santrifüj (Combi – spin, Boeco, Almanya)
Spektrofotometre (WPA Biowave, S2100 Diode Array)

2.3. DNA Safılık ve Miktar Tayini

DNA Miktarının Tayini

İnsan genom DNA (Promega) çözeltisinden tam 5 µl alındı ve onun üstüne 95 µl distile su eklenerek 1/20 oranında dilüe edildi. Spektrofotometrede DNA çözeltilerin 260 nm dalga boyundaki verdikleri absorbans saptanarak alttaki formül ile içerdikleri DNA miktarı tespit edildi.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times d \times l \times 50$$

Formülde gösterilen:

A₂₆₀ : Spektrofotometrede 260 nm' de gösterilen değer.

d: Seyreltme faktörü.

l: Spektrofotometre küvetinin uzunluğu.

50: Çift iplik DNA miktar tayininde kullanılan sabit değer. A₂₆₀ µg/ml verisine dönüştürme katsayısı.

İzole Edilen DNA Saflığının Saptanması

Spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değeri, 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine bölünerek A260 /A280 oranı belirlendi. Oranı 1,7 -2,0 olan DNA örneklerinin iyi bir saflıkta olduğu belirlendi.

2.4. Deney Kurgusu

CYP2D6 geni (1846G > A (rs3892097) polimorfizminin PZR-RPUP ile analizinin kurulması için optimizasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi.

2.5. PZR ve RPUP Optimizasyon Çalışmaları

Uygun PZR koşullarını belirlemek amacıyla <http://www.justbio.com/oligocalc/index.php> internet sayfasından hedeflenen ürünün erime sıcaklığı değerleri ve % GC oranları hesaplanarak teorik olarak uygun olan yapışma ve denatürasyon sıcaklıkları hesaplanmıştır. Aynı zamanda daha önce yayınlanmış çalışmalardan da yararlanılmıştır. Buna göre, CYP2D6 geni *4 alelini içeren bölgenin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında aşağıda verilen dizilimler seçilmiştir:

2D6*4 Forward: 5'- GCC TTC GCC AAC CAC TCC G-3'

2D6*4 Reverse: 5'- AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC-3'

A. PZR Reaksiyonu Komponentleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları

1. Magnezyum iyon (Mg) konsantrasyonu: Amplifikasyon üzerinde meydana gelen etkilerini görmek için Mg iyon konsantrasyonu 1- 3 mM arasındaki değerlerde denenmiştir.
2. Deoksinükleotid trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP) konsantrasyonu: Başarılı ve istenen bölgenin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi için 50, 100, 150, 200 ve 300 µM konsantrasyonlarda denenerek en uygun konsantrasyon saptanmıştır.

3. Primer konsantrasyonları: öncelikle her iki primer 100 pmol/μl konsantrasyonda olacak bir şekilde stokları ayarlandı. Sonradan reaksiyon üzerinde meydana gelen etkilerini görmek için her iki primerin 5, 10, 15, 20 pmol/μl konsantrasyonları ayarlanmıştır.
4. DNA konsantrasyonu: Genomik DNA konsantrasyonları sırasıyla 50,100, 200 ve 300 ng arasındaki farklı konsantrasyonlarda denendi.
5. *Taq* Başarılı ve istenen bölgenin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi için 0.6, 0.8 ve 1U konsantrasyonlarda denenerek en uygun konsantrasyon saptanmıştır.

B. PZR Programı Sıcaklıkları ve Süreleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları

1. Denatürasyon sıcaklığı
Denatürasyon sıcaklığı sırasıyla 92, 94, 95, 96 ve 97 °C sıcaklıklarında denendi 5 dakika olarak denendi.
2. Denatürasyon Sıcaklık süreleri
Denatürasyon sıcaklığı ilk aşamada 3-8 dakika arasında ardından 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1 dakika 30 saniye ve 2 dakika olarak 5 farklı parametrelerde denendi.
3. Primer bağlanma sıcaklığı
PZR amplifikasyonunda kritik parametre olan yapışma sıcaklığı 50, 52, 54, 56 ve 58 °C değerlerde denendi.
4. Primer bağlanma süresi
Yeterince ürün elde edilebilmesi ve tek bir bandın görüldüğü bağlanma süresi için 20, 30, 40, 50 ve 60 saniyelerde primer bağlanma optimizasyonu gerçekleştirildi.
5. Sentez süresi
Genotiplemede bir sonraki aşamada kullanılabilecek kadar ürün elde edilmesinde sentez süresi 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1.5 dakika ve 2 dakikalarda sentez süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.
6. Döngü sayısı
En uygun döngü sayısını tespiti etmek için 20, 25, 30, 35, 40 döngüleri denendi.

C. PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

1. Agaroz tipinin seçimi ve konsantrasyonun belirlenmesi: CYP2D6*4 allelin PZR ürünlerinin tespit edilmesinde agaroz tiplerinden şunlar denenmiştir; basic, gamma ve nu. Bu agaroz tiplerinin her birinin % 0.5, % 0.75, % 1, % 1.5 ve % 2'lik konsantrasyonları hazırlandı.
2. PZR ürün miktarı: PZR ürün miktarı 5, 7.5, 10, 12.5, 15 µl değerlerinde denenmiştir.
3. Volt, amper ve sürenin belirlenmesi: PZR ürünlerinin jel elektrofrezinde tayin edilmesi sırasında denen volt, amper ve süre değerleri aşağıdaki gibidir;
Volt: 75, 100, 125, 175, 200
Amper: 0.5, 1, 2 mA
Süre: 30, 40 50, 60 dakika

D. PZR Ürünün RPUP Optimizasyonu Deneyleri

RPUP optimizasyonu çalışmasında restriksiyon enzim konsantrasyonu, reaksiyon hacim optimizasyonu ve inkübasyon süresi çalışmaları gerçekleştirildi.

1. Restriksiyon enzim konsantrasyonu
Enzim konsantrasyonları 0.5, 1, 1.5 U olarak denenmiştir.
2. Reaksiyon hacmi
Reaksiyon hacimleri 10, 20, 30 µl olarak denenmiştir.
3. İnkübasyon süresi

Yukarıdaki belirtilen parametreler kombinasyonlu olarak 6 saat, 8 saat ve tüm bir gece boyunca inkübasyon süreleriyle karşılaştırıldı.

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak ayarlandı ve tüm bir gece boyunca ısı bloğunda bekletildi, ardından %2 değerindeki gamma agaroz ile hazırlanan jelde yürütüldü. Sonunda kesim ürünlerin en iyi olarak gözlendiği en uygun koşullar tespit edildi.

E. RPUP Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

1. RPUP ürün miktarı

RPUP ürün miktarı 11, 15, 16 µl değerlerinde denenmiştir.

2. Agaroz tipinin seçimi ve konsantrasyonun belirlenmesi: CYP2D6*4 allelin RPUP ürünlerinin tespit edilmesinde agaroz tiplerinden şunlar denenmiştir; basic, gamma nu. Her bir agaroz tipinin %1, %2, %2,5 ve %3'lük konsantrasyonları hazırlandı.

3. Volt, amper ve sürenin belirlenmesi: RPUP ürünlerinin jel elektroforezinde tayin edilmesi sırasında denenilen volt, amper ve süre değerleri aşağıdaki gibidir;

Volt: 75, 100, 125, 175, 200

Amper: 0.5, 1, 2 mA

Süre: 30, 40, 50, 60 dakika

3. BULGULAR

3.1. CYP2D6 Geni *4 Aleli İçin Genotipik Analiz Metodunun Kurulması

CYP2D6 geni *4 aleli genotipik analizi PZR-RPUP yöntemi ile aydınlatılmıştır. Genetik farklılığın aydınlatılabilmesi için kullanılan PZR-RPUP tekniği aşağıdaki üç aşamadan oluşmaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Analizi

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RPUP) Analizi

Genotipin Belirlenmesi

Reaksiyonların optimizasyonunda çeşitli faktörler önemlidir. Başarılı bir amplifikasyon, deoksinükleotit trifosfat konsantrasyonları, oligonükleotitler ve konsantrasyonları, DNA polimeraz ve konsantrasyonu, bağlanma sıcaklığı, döngü sayısı, DNA şablonunun konsantrasyonu, denatürasyon, bağlanma ve uzatma süreleri dahil olmak üzere birçok değişken arasındaki dengenin sonucudur.

3.2. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile Çoğaltılması Optimizasyon Deneylelerinin Sonuçları

3.2.1. Primerler Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında belirlenmiş olan oligonükleotitlerin konsantrasyonları, hedeflenen bölgenin çoğaltılmasında en önemli parametrelerden biridir. Bu amaçla sadece analizi yapılacak insan genomik DNA kısmının çoğaltılıp, primerlerin genomun diğer bölgelerine bağlanmadan sadece tek bandın elde edildiği konsantrasyon optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün A.3 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 5 pmol, 10 pmol, 15 pmol ve 20 pmol konsantrasyonlardaki primer çiftleri denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği primer konsantrasyonu 20 pmol olarak belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4

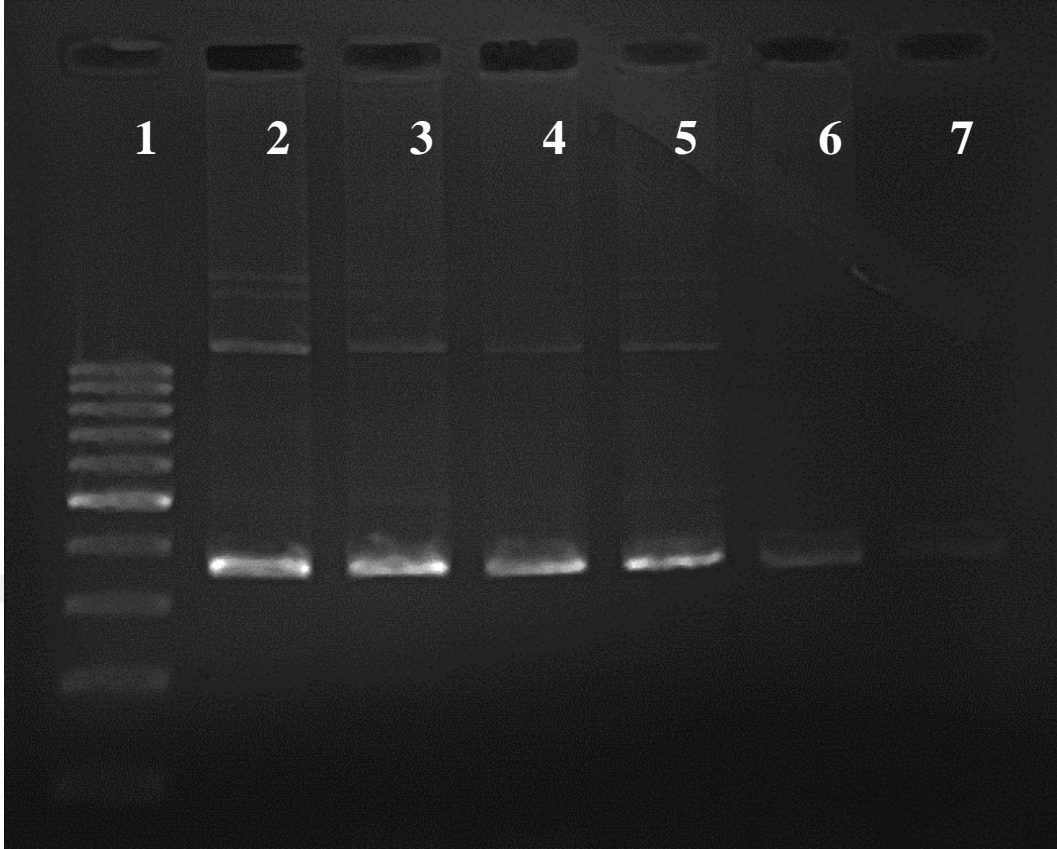
alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında primer konsantrasyonlarının hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.1'de yer almaktadır.



Şekil 3.1. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, primer konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bç DNA marker, 2-5. kolonlar: sırasıyla 20, 15, 10, ve 5 pmol konsantrasyondaki primerler. PZR hedef ürünü: 355 bç.

3.2.2. Magnezyum Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan magnezyum iyonları *Taq* polimerazın aktivitesi için çok önemlidir. Bir jel üzerinde ayrı ürün elde etmek için magnezyum klorür konsantrasyonları her PZR reaksiyonu için ayarlanmalıdır. Bu nedenle sadece analizi yapılacak insan genomik DNA kısmının çoğaltılmasında magnezyum iyonunun ekstra bandların gözlenmediği konsantrasyon optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün A.1 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 3.0 mM, 2.50 mM, 2.25 mM, 2.0 mM, 1.50 mM ve 1.0 mM konsantrasyonlardaki magnezyum iyon değerleri denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği magnezyum iyon konsantrasyonu 1.50 mM olarak belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında magnezyum iyon konsantrasyonlarının hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.2'de yer almaktadır.

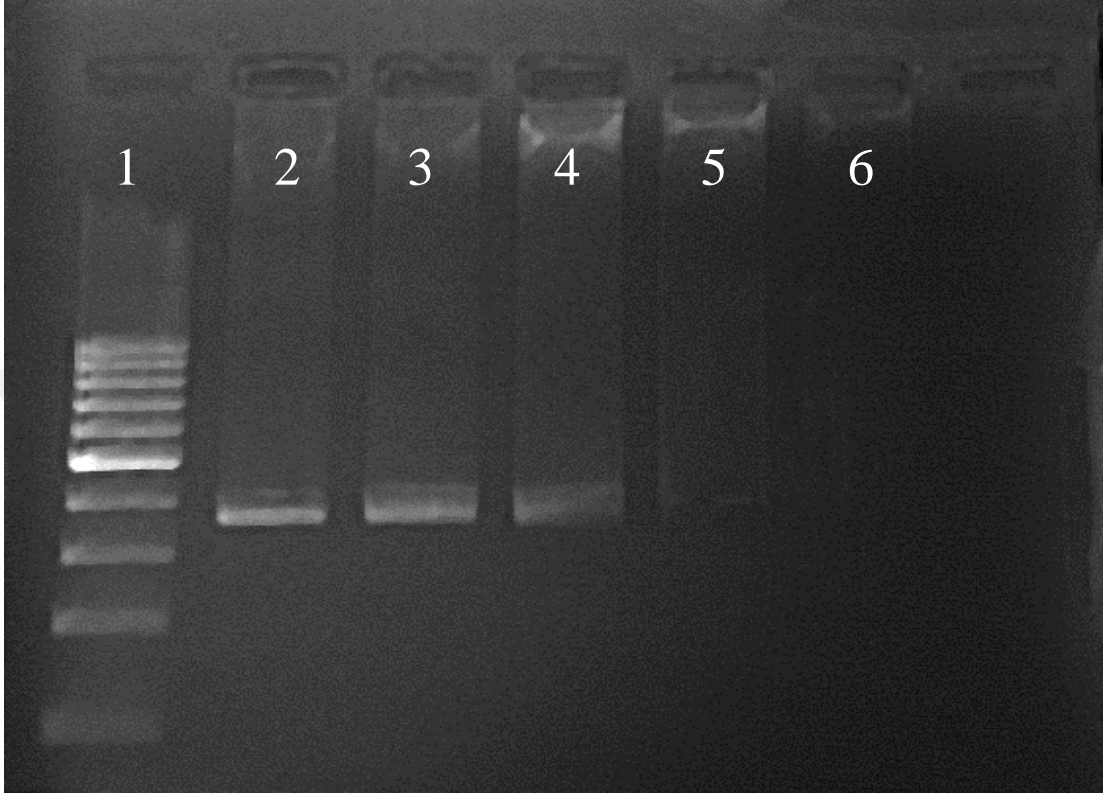


Şekil 3.2. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, magnezyum konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bç DNA marker, 2-7. kolonlar: sırasıyla 3.0, 2.50, 2.25, 2.0, 1.50 ve 1.0 mM konsantrasyondaki magnezyum içeren PZR ürünleri. PZR hedef ürünü: 355 bç.

3.2.3. Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP) Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında belirlenmiş olan deoksinükleotid konsantrasyonları, genomik DNA'nın sentezi için hem enerji hem de nükleositleri sağlamaktadır. Bu amaçla analizi yapılması istenen insan genomik DNA bölgesinin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi için dNTP konsantrasyonunun hiç ekstra band oluşmadan sadece tek bandın elde edildiği konsantrasyon optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün A.2 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 300 μ M, 200 μ M, 150 μ M, 100 μ M ve 50 μ M dNTP konsantrasyonlardaki değerler denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği dNTP konsantrasyonu 200 μ M olarak

belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında dNTP konsantrasyonlarının hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.3'te yer almaktadır.



Şekil 3.3. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, dNTP konsantrasyonunun, PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bç DNA marker, 2-6. kolonlar: sırasıyla 300, 200, 150, 100 ve 50 µM dNTP içeren PZR ürünleri. PZR hedef ürünü: 355 bç.

3.2.4. İnsan Genomik DNA Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan genomik DNA konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerinde hedeflenen bölgenin çoğaltılmasında en başarılı ve istenen bölgenin en doğru şekilde çoğaltılabilmesini elde edildiği genomik DNA konsantrasyon optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün A.4 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 50 ng, 100 ng, 200 ng ve 300 ng konsantrasyonlardaki genomik DNA değerleri denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği genomik DNA konsantrasyonu 200ng olarak belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4 alelini

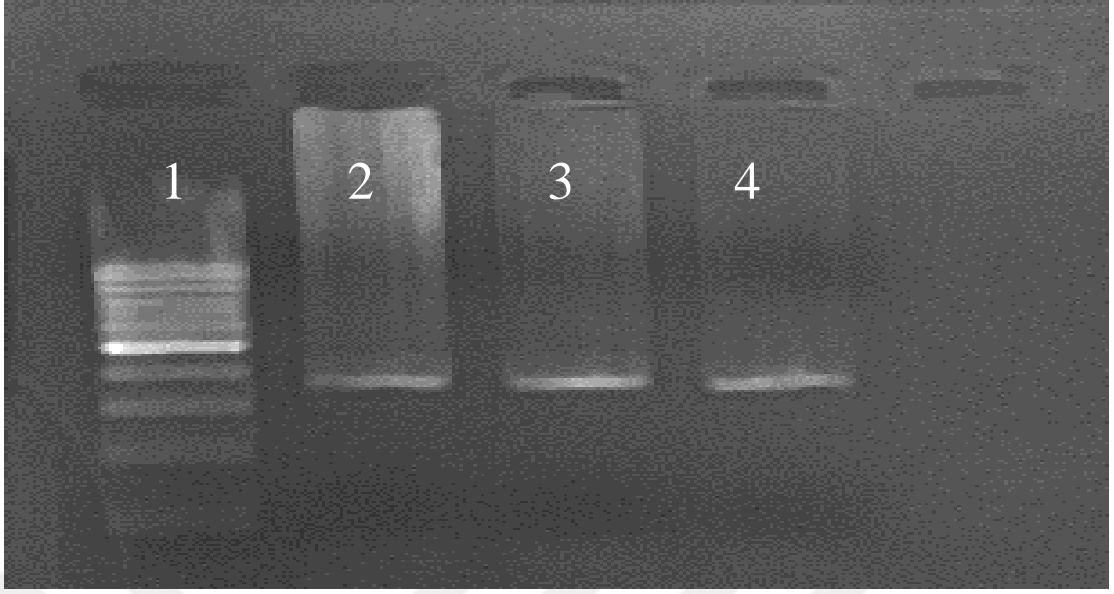
içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında genomik DNA bölgesinin hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.4'te yer almaktadır.



Şekil 3.4. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, genomik DNA konsantrasyonlarının PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bç DNA marker, 2-5. kolonlar: sırasıyla 50, 100, 200 ve 300 ng konsantrasyondaki genomikDNA örnekleri. PZR hedef ürünü: 355 bç.

3.2.5. *Taq* DNA Polimeraz Konsantrasyon Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında belirlenmiş olan *Taq* polimeraz konsantrasyonları, hedeflenen bölgenin çoğaltılmasında ısı stabilite sıcaklığındaki optimum avantajları ile PZR reaksiyonu için en çok kullanılan DNA polimeridir. Analizi yapılacak insan genomik DNA kısmının çoğaltılıp, primerlerin genomun diğer bölgelerine bağlanmadan sadece tek bandın elde edildiği konsantrasyon optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün A.5 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 1.0 U, 0.80 U, ve 0.60 U konsantrasyonlardaki *Taq* DNA polimeraz değerleri denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu 1.0 U olarak belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonlarının hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.5'te yer almaktadır.



Şekil 3.5. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonunun PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bp DNA marker, 2-4. kolonlar: sırasıyla 1.0, 0.80, ve 0.60 U *Taq* DNA polimeraz içeren PZR ürünleri. PZR hedef ürünü: 355 bp.

3.2.6. PZR Döngü Sayısı Optimizasyon Sonucu

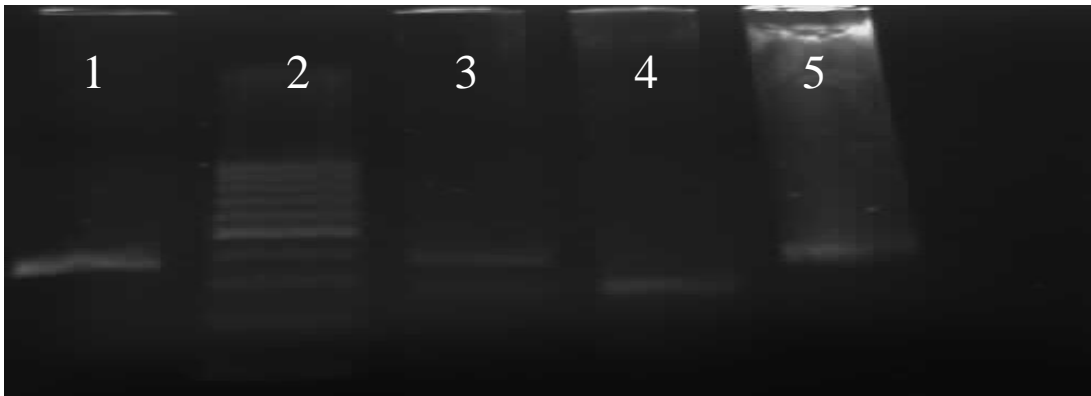
CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında belirlenen reaksiyon döngü sayıları, hedeflenen bölgenin çoğaltılmasındaki önemli faktörlerden biridir. Hedeflenen insan genomik DNA kısmının çoğaltılmasında, en iyi şekilde elde edildiği primerlerin genomun diğer bölgelerine bağlanmadan sadece tek bandın elde edildiği reaksiyon döngü sayısı optimizasyon deneyi Gereç ve Yöntem bölümünün B.6 kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Doğru bölgenin çoğaltılmasında en iyi ürün elde edilmesinde 40, 35, 30, 25 ve 20 döngü sayıları denenmiştir. Sonraki analizlerde hedeflenen dizilimin en verimli ve doğru bir şekilde elde edildiği döngü sayısı 35 olarak belirlenmiştir. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ile çoğaltılmasında döngü sayısının hedeflenen ürün üzerine olan etkisi Şekil 3.6'da yer almaktadır.



Şekil 3.6. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında reaksiyon döngü sayısının PZR ürünü üzerine olan etkisi. Birinci (1) kolon: 100 bç DNA marker, 2-6. kolonlar: sırasıyla 40, 35, 30, 25 ve 20 döngü sayılı PZR ürünleri. PZR hedef ürünü: 355 bç.

3.2.7. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RPUP) Analiz Optimizasyon Sonucu

CYP2D6 geni *4 alelini içeren genom diziliminin PZR ürünlerinin RPUP analizine ait optimizasyon deneyinde 355 bç içeren PZR ürünü, GA genotipinde (355-250-105 bç) PZR ve kesim ürünleri, GG genotipinde (250-105 bç) kesim ürünleri ve AA genotipinde ise (355 bç) olan PZR ürünü elde edilmiştir. Bu analize ait tüm genotiplerin gözlemlendiği agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.7'de yer almaktadır.



Şekil 3.7. CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR-RPUP yöntemi ile genotipik analizin agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. Birinci (1) kolon: 355 bç içeren PZR ürünü, ikinci (2) kolon: 100 bç DNA marker, 3-5. kolonlar sırasıyla GA genotipinde (355-250-105 bç) olan PZR ürünü, GG genotipinde (250-105 bç) olan PZR ürünü ve AA genotipinde (355 bç) olan PZR ürünü.

3.3. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile oğaltılmasında PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları

3.3.1. Denatürasyon Sıcaklığı

Denatürasyon sıcaklığı sırasıyla 92, 94, 95, 96 ve 97 °C sıcaklıklarında 5 dakika olarak denendi. En uygun denatürasyon sıcaklığının 94 °C olduğu gözlemlendi.

3.3.2. Denatürasyon Sıcaklık Süreleri

Denatürasyon sıcaklığı ilk aşamada 3-8 dakika arasında ardından 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1 dakika 30 saniye ve 2 dakika olarak 5 farklı parametrelerde denendi. En iyi olan sonuçlar ilk denatürasyon için 5 dakika, sonraki denatürasyon için 1 dakika olarak tespit edildi.

3.3.3. Primer Bağlanma Sıcaklığı

PZR amplifikasyonunda kritik parametre olan yapışma sıcaklığı 50, 52, 54, 56 ve 58 °C arasındaki farklı değerlerde denendi ve en uygun yapışma sıcaklığı 52 °C olarak tespit edildi.

3.3.4. Primer Bağlanma Süresi

Yeterince ürün elde edilebilmesi ve tek bir bandın görüldüğü bağlanma süresi için 20, 30, 40, 50 ve 60 saniyelerde primer bağlanma optimizasyonu gerçekleştirildi. En iyi sonuç 60 saniyede elde edildi.

3.3.5. Sentez Süresi

Genotiplemede bir sonraki aşamada kullanılabilir kadar ürün elde edilmesinde sentez süresi 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1.5 dakika ve 2 dakikalarda sentez süresi optimizasyonu gerçekleştirildi. En iyi sonuç 2 dakika sentez süresi ile elde edildi.

3.4. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Belirlenmesine Yönelik Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları

3.4.1. Agaroz Tipinin Seçimi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi

CYP2D6*4 allelin PZR ürünlerinin tespit edilmesinde agaroz tiplerinden şunlar denenmiştir; basic, gamma ve nu. Bu agaroz tiplerinin her birinin %1, %2, %2,5 ve %3'lük konsantrasyonları hazırlandı. En iyi sonuç ise % 2 değerinde hazırlanan basic agaroz tipi ile alındı.

3.4.2. PZR Ürün Miktarı

PZR ürün miktarı 5, 7.5, 10, 12.5, 15 µl değerlerinde denendi ve en uygun miktarın 12.5 µl olduğu tespit edilmiştir.

3.4.3. Volt, Amper ve Sürenin Belirlenmesi

PZR ürünlerinin jel elektroforezinde tayin edilmesi sırasında denenen volt, amper ve süre değerleri aşağıdaki gibidir;

Volt: 75, 100, 125, 175, 200

Amper: 0.5, 1, 2 mA

Süre: 30, 40 50, 60 dakika

Bu değerler arasında farklı kombinasyonlar yapıldı ve sonunda en iyi olan sonuç 125 V, 0.5 mA ve 30 dakika olarak tespit edildi.

3.5. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile PZR Ürünlerinin RPUP Analizine Ait Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları

RPUP optimizasyonu çalışmasında restriksiyon enzim konsantrasyonu, reaksiyon hacim optimizasyonu ve inkübasyon süresi çalışmaları gerçekleştirildi.

3.5.1. Restriksiyon Enzim Konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonları 0.5, 1, 1.5 U olarak denenmiştir. Ürünün tam olarak kesilmesini sağlayan enzim konsantrasyonu 1 U olarak saptanmıştır.

3.5.2. Reaksiyon Hacmi

Reaksiyon hacimleri 10, 20, 30 µl olarak denenmiştir. En uygun olan reaksiyon hacmin 20 µl olduğu belirlendi.

3.5.3. İnkübasyon Süresi

Yukarıdaki belirtilen parametreler kombinasyonlu olarak 6 saat, 8 saat ve tüm bir gece boyunca inkübasyon süreleriyle karşılaştırıldı. En iyi inkübasyon süresinin gece boyunca olduğu tespit edildi.

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak ayarlandı ve tüm bir gece boyunca ısı bloğunda bekletildi, ardından %2 değerindeki gamma agaroz ile hazırlanan jelde yürütüldü. Sonunda kesim ürünlerin en iyi olan şekilde görüldüğü en uygun koşullar tespit edildi.

3.6. CYP2D6 Geni *4 Alelini İçeren Genom Diziliminin PZR ile RPUP Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi Analizine Ait Optimizasyon Deneylerinin Sonuçları

3.6.1. RPUP Ürün Miktarı

RPUP ürün miktarı 11, 15, 16 µl değerlerinde denendi ve en uygun olan miktarın 11 µl olduğu saptandı.

3.6.2. Agaroz Tipinin Seçimi ve Konsantrasyonun Belirlenmesi

CYP2D6*4 allelin RPUP ürünlerinin tespit edilmesinde agaroz tiplerinden şunlar denenmiştir; basic, gamma nu. Her bir agaroz tipinin %1, %2, %2,5 ve %3' lük konsantrasyonları hazırlandı. En iyi olan sonuç ise %2 değerinde hazırlanan gamma agaroz tipi ile alındı.

3.6.3. Volt, Amper ve Sürenin Belirlenmesi

RPUP ürünlerinin jel elektrofrezinde tayin edilmesi sırasında denenen volt, amper ve süre değerleri aşağıdaki gibidir;

Volt: 75, 100, 125, 175, 200

Amper: 0.5, 1, 2 mA

Süre: 30, 40, 50, 60 dakika

Bu değerler arasında farklı kombinasyonlar yapıldı ve sonunda en iyi olan sonuç 125V, 0.5 mA ve 30 dakikada tespit edildi.

Yaptığımız tüm bu optimizasyon çalışmalarımızın sonucu olarak CYP2D6*4 alleli için araştırmamızda kullanılacak olan PZR reaksiyonu, PZR programı ve RPUP tekniğiyle ilgili parametreler aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. CYP2D6*4 geni için PZR reaksiyon konsantrasyonları (A), PZR programı (B), RPUP koşulları (C)

A) PZR Reaksiyon Konsantrasyonları

BİLEŞEN	MİKROLİTRE µl	ANA KONS.
Tampon	2.5	10 X
Magnezyum	1.5	1.50 mM
dNTP	2.5	200 µM
Primer	1-1	20 pmol
<i>Taq</i>	0.125	1 U / µl
Su	...	-
DNA	3	200 ng/µl
Toplam hacim	25	

B) PZR Programı

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	5 dak	1
94 °C	1 dak	35
52 °C	1 dak	
72 °C	2 dak	
72 °C	5 dak	1

C) RPUP Koşulları

BİLEŞEN	MİKROLİTRE µl	ANA KONS.
PZR ürünü	12.5	-
RE tamponu	2	10X
RE (Mva I)	1	10 U / µl
Su	4.5	-
Toplam hacim	20	-

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olarak ayarlanıp tüm gece ısı bloğunda bekletildi, ardından %2'lik gamma agaroz ile hazırlanan jelde yürütüldü. Böylece kesim ürünlerin en iyi şekilde görüldüğü koşullar belirlendi.

4. TARTIŞMA

4.1. CYP2D6 Geni *4 Aleli İçin Genotipik Analiz Metodunun Değerlendirilmesi

Çalışmamızda CYP2D6 geni *4 aleli için genotipik analiz metodunun geliştirilmesi için PZR-RPUP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle gerçekleştirilen genotipik analiz metodunun en başarılı şekilde sonuçlanması için PZR reaksiyonu koşulları komponentleri ile ilgili optimizasyonlar, PZR programı ile ilgili sıcaklık ve süre optimizasyonları, PZR ürünlerinin jel elektroforezinde belirlenmesine yönelik çalışmalar, PZR ürünün RPUP optimizasyonu, RPUP ürünlerinin jel elektroforezi ile belirlenmesi gibi çalışmalardan elde ettiğimiz sonuçlar tezin BULGULAR kısmında ayrı ayrı belirtilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar kurmak istediğimiz genotipik analiz metodu için en uygun verileri göstermiştir, dolayısıyla CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesi PZR-RPUP yöntemi ile agaroz jel elektroforezde başarılı şekilde tespit edildiğini belirtmiştir.

4.1.1. Primerler

Herhangi bir PZR uygulamasının başarılı olmasının en önemli basamağı uygun primerler kullanılmasıdır. Oligonükleotid primerleri genellikle 18-30 baz uzunluğunda sentezlenir. Primer dizisi, amplifiye edilecek istenen hedefin tam bir eşleşmesi olmalı ve gerçekten de, şablon karışımındaki herhangi bir başka diziye benzer bir homolojiye sahip olmamalıdır (McPherson, 1995). Tipik bir PZR reaksiyonu için, oligonükleotid primerlerinin G ve C bileşimleri% 50-60'tır. Ek olarak, primer dizileri, özellikle 3 'reaksiyonunda, minimal ikincil yapıya (yani, kendi kendini tamamlayıcılık) sahip benzer G+C bileşimi olmalı ve birbirlerini tamamlayıcı olmalıdır (McPherson, 1991).

Optimal primer-şablon oranı, PZR'deki önemli kavramlardan biridir. Oran çok yüksek ise, fazla primer koşulları altında meydana geldiği gibi primer dimerler oluşur. Oran çok düşükse, ürün katlanarak birikmez, yeni sentezlenen zincir denatürasyondan sonra yeniden biçimlenir (Brown, 1993).

Çoğu PZR uygulaması için, her iki primerin de aynı konsantrasyona sahip olması gerekir. Primer konsantrasyonu, şablon konsantrasyonundan bağımsız olarak 0.5 μ M'den yüksek olmamalıdır (Kidd ve Ruano, 1995). Primer fazlalığı olarak yüksek dezavantajlı primer konsantrasyonları, primer dimerlerin oluşmasına ve aşırı baskı yapılmasına neden olabilir. Bu nedenle, çok seyreltik şablonlar için, daha düşük primer konsantrasyonları en iyi sonuçları verir. 50 ul'lik bir reaksiyon için, primer konsantrasyonu genellikle primer başına 25-100 pmol'dur (McPherson, 1991).

Yaptığımız çalışmada en başarılı sonuç veren primer konsantrasyonu 20 pmol olarak tespit edildiştir.

4.1.2. Magnezyum

Taq polimeraz aktivitesi için serbest magnezyum iyonları gereklidir. Bir jel üzerinde yeterli ve doğru ürün elde etmek için magnezyum klorür konsantrasyonları PZR reaksiyonu için ayarlanmalıdır. Bu nedenle, CYP2D6 geni *4 alelini içeren genomik DNA bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında optimal magnezyum klorür konsantrasyonunu belirlemek üzere deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, magnezyum klorür konsantrasyonları 0 mM ve 2 mM arasında ayarlanmıştır. Magnezyum klorür rutin PZR reaksiyonunun konsantrasyonu, standart PZR tamponunda 1.5 mM'dur.

Yaptığımız çalışmada en iyi sonuç veren Magnezyum iyon konsantrasyonu 1.5 mM olarak belirlenmiştir.

4.1.3. Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)

Deoksinükleotitler, DNA'nın sentezi için hem enerji nükleositleri sağlar. Reaksiyon karışımları 800 μ M'den fazla toplam dNTP içeremez, çünkü 50 μ l'lik bir reaksiyonda kabaca 13 μ g DNA üretmek için yeterlidir (Brown, 1990) . Nükleotitler, ısıya oldukça dayanıklıdır ve bir PZR amplifikasyonunda 40'tan fazla termal döngü raf ömrüne sahiptir. (McPherson, 1991) 200 μ M'lik bir başlangıç

konsantrasyonu verildiğinde, son dNTP konsantrasyonu, termal döngü sırasında% 50'lik bir bozulma bile olsa 104 oranını aşmıştır. (Kidd ve Ruano, 1995) .

Yaptığımız çalışmada hedeflenen dizilimin en verimli bir şekilde elde edildiği dNTP konsantrasyonu 200µM olarak belirlenmiştir.

4.1.4. DNA and *Taq* Polimeraz

Taq polimeraz, PZR reaksiyonu için en yaygın kullanılan DNA polimerazdır. Isı stabilitesi sıcaklık optimum avantajları onu ideal bir seçim haline getirmektedir. *Taq*'ın izin verdiği yüksek polimerizasyon sıcaklıkları, primerin şablona daha fazla bağlanmasını hızlandırmaktadır. *Taq* polimeraz aktivitesi nispeten geniş bir pH aralığında, 8,2 ila 9,0 arasında 10 mM'de (25 ° C'de ölçülmüş) optimaldir. Tipik bir reaksiyonda, enzim 92 ° C'de 2 saatten fazla bir ömre sahiptir, ancak 95 ° C'de sadece 40 dakika 97.5 ° C'de 6 dakikadan azdır. 1 nM'de başlayan hedefin 106 misli amplifikasyonundan sonra, enzim molekülleri ile yaklaşık olarak aynı sayıda hedef molekül meydana gelmektedir. Amplifikasyon reaksiyonunun özgüllüğünü kontrol etmek için sınırlayıcı konsantrasyon gereklidir. 2.5 nM'den fazla enzimin (25 µl reaksiyon başına 1.25 U) konsantrasyonundan kaçınılmalıdır (Kidd Ruano, 1995), çünkü fazla miktarda DNA polimeraz, sahte primer-şablon etkileşimlerinden DNA sentezleyebilir (Saiki ve ark., 1988).

Yaptığımız çalışmada en uygun bir şekilde sonuç sağlayan genomik DNA konsantrasyonu 200 ng, *Taq* polimeraz konsantrasyonu 1.0 U olarak belirlenmiştir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezin amacı CYP2D6 genindeki CYP2D6*4 izoformu olarak adlandırılan tek nükleotid polimorfizmi rs3892097 üzerindeki farklılığın aydınlatılmasını sağlayacak güvenilir ve uygun bir yöntem geliştirmektir. Gerek adli toksikoloji vakalarında gerekse klinikte rutin analiz haline getirilmesi amaçlanmış olup, analizler insan genomik DNA'sında gerçekleştirilmiştir. Genetik farklılığın aydınlatılabilmesi için ucuz, basit ve kullanışlı olan bir genotipik analiz yöntemi olarak polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR-RPUP) tekniği kullanılmıştır. Çalışmamızda CYP2D6 geninde yer alan tek nükleotid değişiminin saptanması için en uygun parametreler belirlenmiştir.

Çeşitli ilaçlar ve kimyasal maddelerin neden olabileceği zararlı etkiler onların vücuttan uzaklaştırılmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteleri ile ilişkilidir. Bu enzimlerin önemli bir üyesi de Sitokrom P450 2D6 (CYP2D6) proteindir. Bir ilaç metabolize eden enzimi kodlayan gendeki mutasyonlar, yüksek, düşük veya hiç aktivite göstermeyen enzim varyantlarına neden olur. ZM'lerde, normal dozdan sonra bile aşırı veya uzun süreli terapötik etki veya ilaca bağlı toksisite ortaya çıkabilir. CYP2D6 ile metabolize olan ilaçlar ve diğer kimyasallar çok fazla miktardadır. CYP2D6'nın enzimatik aktivitesi, bireyin genetik yapısına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Fonksiyonel olmayan CYP2D6*4 haplotipleri temsil eden tek nükleotid polimorfizm (TNP) CYP2D6 rs3892097, enzimin fonksiyonel açıdan yetersiz bir enzim varyantına neden olur. Böylece bu sık görülen CYP2D6 varyant enzim aktivitesinde azalmaya yol açarak metabolizmanın yavaşlamasına neden olur.

CYP450 enzimlerinin genetik polimorfizmleri ve diğer ilaçlar ile etkileşimleri, akut toksisite, serum ksenobiyotik düzeyleri ve tedavi süresindeki semptomları önemli ölçüde etkileyebilir. 44 yaşında bir kadın intihar girişiminde 4.5g amitriptilin alındıktan sonra acil servise başvurmuştur. Sunum sırasında hasta uyanık ve normal yaşamsal bulgularla yönlendirilmiştir. İlaç alındıktan 96 saat sonra serum trisiklik antidepresan (TSA) seviyeleri 224 mikrogram (μg) / mililitre (ml) amitriptilin seviyesi ve 584 mg / ml nortriptilin seviyesi, toplamda 808 mg / ml'lik bir TSA seviyesinin birikmesi gösterilmiştir (referans 80–200 μg / ml). 14. günde, hasta başarılı bir şekilde ekstübe edilmiştir ve herhangi bir karışıklık veya ajitasyon

göstermemiştir. PZR analizi ile genotip testi hastayı CYP2D6 4/4 ile (ZM), homozigot olarak tanımlamıştır. Amitriptilin, çeşitli diğer izoenzimler, özellikle CYP2C19 tarafından nortriptiline dönüştürülür. (Olesen ve Linnet,1997; Hicks ve ark., 2013).

Günlük hayatımızda, yukarıdaki gibi CYP450 enzimlerinin genetik polimorfizmleri ile ilgili adli vakalar az değildir, örnek olarak tezimizin 1.3 bölümünde bahsettiğimiz CYP2D6 substratlarıyla ilişkili ölümcül ilaç zehirlenmelerinin postmortem toksikoloji vakalarını araştırırken, CYP2D6 * 3/*4 genotipli (ZM) bir hastada ölümcül ve görünüşte kazara doksepin zehirlenmesi olgusunun olması; CYP2D6 *4/*5 genotipli (ZM) 14 yaşındaki bir hastanın kafein ve parasetamol (asetaminofen) ile birlikte 60 mg kodein aldıktan sonra nalokson tedavisi ile nörolojik semptomlarının düzeltilmesi; CYP2D6 *4/*4 genotipi olan bir CYP2D6 ZM olarak tanımlanan 55 yaşındaki Beyaz ırktan bir kadında klinik seyri ve toplam trisiklik antidepresan konsantrasyonlarının (Amitriptilin Nortriptilin, immünoassay ile ölçülen) bildirilmesi; 33 yaşında, 3g venlafaksin alan ve uzun süreli bir eliminasyon yarı ömrüne sahip olan beyaz ırktan bir kadın olgusunun, CYP2D6 ZM durumundan dolayı 15.3 saat (5 saat yerine) olarak tahmin edilmesi; tamamen defektif bir CYP2D6 genotipine (ZM) sahip 9 yaşındaki bir çocuğa ait ölümcül bir zehirlenme vakasında, ölüm vakası olarak fluoksetin toksisitesininin sunulması gibi örnek vakalarda, CYP2D6 ZM'leri olan veya potansiyel olarak etkileşimli ilaçlar alan hastalar, terapötik doz alırken aşırı ilaç birikimi sorunu ile karşılaşabilmektedir. Böylece bu vakalar bize sitokrom P450 2D6 genindeki rs3892097 polimorfizmi için genotipik analiz yöntemi kurulmasının hem klinik hem adli toksikoloj açısından ne kadar yüksek önem taşıdığını ve bu yöntemin hastalara uygulanmasında olası vakaların önlenmesinde hakikaten fayda olduğunu göstermektedir.

Adli toksikoloji, son yıllarda bir adli bilim olarak gelişmiştir ve günümüzde yaygın olarak ölüm araştırmalarına, uyuşturucu kullanımını içeren sivil ve cezai konularda, düzeltme tesislerinde uyuşturucu bağımlılığının tespit edilmesinde, yol ve işyeri güvenliği ve çevre kirliliği ile ilgili konularda ve spor dopinginde kullanılmaktadır. En yaygın şekilde hedeflenen ilaçlar arasında amfetaminler, benzodiazepinler, esrar, kokain ve opiatlar bulunur, ancak herhangi bir başka yasadışı madde veya hemen hemen her reçetesiz veya reçeteli ilaç ve ayrıca topluma

açık zehirler de olabilir. Disiplin, sağlam bir farmakoloji ve farmakokinetik bilgisine sahip analitik tekniklerde ileri düzeyde beceriler gerektirmektedir (Drummer, 2010). Postmortem toksikolojik sonuçların yorumlanması, bir takım eksiklikler nedeniyle her zaman kolay bir iş değildir. Birçok madde için toksik ve öldürücü ilaç konsantrasyonları arasında keskin bir ayırım çizgisi yoktur. Postmortem genotiplendirme ve metabolit/ana ilaç oranlarının analizinin, adli toksikolojik sonuçların yorumlanmasına yönelik öngörülerini sağladığı öne sürülmüştür.

İnsanlarda hızlı ve stresli yaşam tarzından dolayı depresyon ve türlü psikolojik hastalıklar gelişebilmektedir. Bunların tedavisi için antidepresan ve antipsikotik ilaçları kullanılmaktadır. CYP2D6 geni ise bu ilaçların metabolizmasında yer almaktadır. Bu ilaçları kullanan bazı hastalarda toksisite ve intihar riski bulunduğu için, CYP2D6 genindeki farklılığın aydınlatılmasını sağlayacak bu analiz yönteminin kurulması, klinik açıdan sahip oldukları genetik farklılıktan dolayı zayıf metabolize edicilerde ortaya çıkabilecek olan zararlı etkilerin önlenmesine, adli toksikoloji açısından intihar gibi beklenmedik adli vakaların aydınlatılmasında yüksek önem taşımaktadır.

ÖZET

Sitokrom P450 2D6 Geni rs3892097 Polimorfizmi İçin Genotipik Analiz Yöntemi Geliştirilmesi

Sitokrom P450 (CYP, EC1.14.14.1) süper ailesi, en önemli Faz I ilaç metabolize eden enzimleri temsil etmektedir. Enzimlerin bu büyük süper ailesi, antipsikotikler, analjezikler, antidepresanlar, antiaritmikler, ve β -blokerler gibi ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda ve aynı zamanda steroid hormonları gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında yer almaktadır. Çoğu CYP'ler inhibisyona ve indüksiyona tabidir ve genetik mutasyonlar birçok CYP'nin enzim aktivite farklılığında önemli bir rol oynamaktadır. Hasta gruplarındaki farklı enzimatik aktivite ve P450 regülasyonu, birçok ilacın farmakolojik aktivitesinde değişiklikler meydana getirir ve oldukça yararlı bir ilacın yan etkilerinin de ortaya çıkmasına neden olabilir. Sitokrom P450 2D6 (CYP2D6), sitokrom P450 süper ailesinin bir üyesidir. Çeşitli ilaçların metabolizmasından sorumlu olan CYP2D6, ilaç metabolize eden sitokrom P450'ler içinde, sahip olduğu polimorfizmler ve bunların biyolojik fonksiyonu açısından genetik farklılıkların rolünün anlaşılabilmesi için iyi bir örnek olarak bilinmektedir. CYP2D6, mevcut terapötik ilaçların en az % 25'inin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bir ilaç metabolize eden enzimi kodlayan gendeki mutasyonlar, yüksek, düşük veya hiç aktivite göstermeyen enzim varyantlarına neden olur. Zayıf metabolize edicilerde, normal dozdan sonra bile aşırı veya uzun süreli terapötik etki veya ilaca bağlı toksisite ortaya çıkabilir. CYP2D6 ile metabolize olan ilaçlar ve diğer kimyasallar çok fazla miktardadır. Bu tezin amacı CYP2D6 genindeki farklılığın aydınlatılmasını sağlayacak bir analiz yönteminin kurulmasıdır. Bu doğrultuda, hedeflenen gen bölgesinin spesifik olarak ve yeterli miktarda çoğaltıldığı PZR şartları, G1934A baz değişikliğinin saptandığı RPUP şartları ve amplifikasyon ile kesim ürünlerinin aydınlatıldığı elektroforez şartları belirlenmiştir. Böylece kurulan genotipik analiz yöntemi, CYP2D6 ile metabolize edilen ilaçlarla meydana gelen zehirlenme ve ölüm vakalarının aydınlatılmasında genetik farklılığın rolünün ortaya konmasında, ayrıca sahip oldukları genetik farklılıktan dolayı zayıf metabolize edicilerde ortaya çıkabilecek olan zararlı etkilerin önlenmesinde potansiyeli bulunmaktadır. Geliştirilen metod, gerek adli toksikoloji vakalarında gerekse klinikte rutin analizlerde kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Sitokrom P450, CYP2D6, İlaç metabolizması, Genetik analiz yöntemi, Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, Adli toksikoloji.

SUMMARY

Development of Genotypic Analysis Method for rs3892097 Polymorphism in Cytochrome P450 2D6 Gene

The cytochrome P450 (CYP, EC1.14.14.1) superfamily represents the most significant phase I drug metabolizing enzymes. This large superfamily of enzymes is associated with the biotransformation of drugs, such as antipsychotics, analgesics, antidepressants, antiarrhythmics and β -blockers and other xenobiotics, further in the metabolism of endogenous compounds including steroid hormones. Most of the CYPs are subject to inhibition and induction, and genetic mutations play a vital role in the enzyme activity variation of many CYPs. Variations in enzymatic activity and pattern of P450 regulation in various groups of patients might be responsible for variations in the pharmacological activity of many drugs and lead to adverse side effects of a commonly highly beneficial medication. Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) is identified as a member of the cytochrome P450 superfamily. In the drug-metabolizing cytochrome P450s, CYP2D6, is responsible for the metabolism of various drugs, has been known as a good example in terms of its polymorphisms and their biological functions for understanding the role of genetic differences. CYP2D6 plays a significant role during the metabolism of at least 25% of current therapeutic drugs. Enzyme variants with high, low or no activity are caused by the mutations in a gene coding for a drug metabolizing enzyme. Poor metabolizers may cause an extreme or prolonged therapeutic effect or drug-related toxicity after a normal dose. CYP2D6 metabolic drugs and other chemical substances are abundant. The purpose of this thesis is to establish a genotypic method to elucidate the variation in the CYP2D6 gene. Accordingly, PCR conditions in which the targeted gene region was specifically and adequately amplified, RFLP conditions in which G1934A base change was detected, and electrophoresis conditions in which amplification of the cut products were determined. Thus, the established genotypic analysis method has the potential in elucidation of the role of genetic difference in intoxication and death cases caused by drugs metabolized by CYP2D6, and also in preventing harmful effects that may occur in poor metabolizers due to their genetic differences. The developed method can be used for routine analysis in both forensic toxicology and in clinical cases.

Keywords: Cytochrome P450, CYP2D6, Drug metabolism, Genetic analysis method, Restriction fragment length polymorphism, Forensic toxicology.

KAYNAKLAR

- ABBUD ZA, WILSON AC, COSGROVE NM & KOSTIS JB (1998). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* **81**: 244–246.
- ABDULJALIL K, FRANK D, GAEDIGK A, KLAASSEN T, TOMALIK-SCHARTE D, JETTER A, FUHR U. (2010). Assessment of activity levels for CYP2D6 *1, CYP2D6*2, and CYP2D6*41 genes by population pharmacokinetics of dextromethorphan. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **88**: 643–651.
- ABRAHAM BK, ADITHAN C. Genetic polymorphism of CYP2D6 (2001). *Indian Journal of Pharmacology* **33**: 147-169.
- AGUNDEZ JA, LEDESMA MC, LADERO J M, BENITEZ J (1995). Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Ther Clin Pharmacol* **57**:265–269.
- AKLILLU E, PERSSON I, BERTILSSON L, JOHANSSON I, RODRIGUES F. INGELMAN-SUNDBERG M. (1996). Frequent distribution of ultra- rapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* **278**:441–446.
- ALFIREVIC A, AND PIRMOHAMED M. (2010). Drug-induced hypersensitivity reactions and pharmacogenomics: past, present and future. *Pharmacogenomics* **11**: 497–499.
- ALVÁN G, BECHTEL P, ISELIUS L, GUNDERT-REMY U (1990). Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol* **39**:533–7.
- ARMSTRONG M, DALY AK, CHOLERTON S, BATEMAN DN, IDLE JR (1992) Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* **339**: 1017-1018.
- AYNACIOGLU AS, SACHSE C, BOZKURT A, KORTUNAY S, NACAK M, SCHRÖDER T, KAYAALP SO, ROOTS I, BROCKMÖLLER J (1999). Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* **66**:185-92.
- BACHMANN K (2009). *Drug Metabolism, Pharmacology*, Pages 131–173.
- BACHUS R, BICKEL U, THOMSEN T, ROOTS I, KEWITZ H (1999). The O-demethylation of the antidementia drug galanthamine is catalysed by cytochrome P450 2D6. *Pharmacogenetics*; **9**: 661-8.

- BARANY F (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:189–93.
- BARNER EL, GRAY SL (1998). Donepezilusein Alzheimer disease. *Ann Pharmacother* **32**: 70-7.
- BATTY JA, HALL AS, WHITE HL, WIKSTRAND J, DE BOER RA, VAN VELDHUISEN DJ, VAN DER HARST P, WAAGSTEIN F, HJALMARSON A, KJEKSHUS J, BALMFORTH AJ. MERIT-HF STUDY GROUP (2014). An investigation of CYP2D6 genotype and response to metoprolol CR/XL during dose titration in patients with heart failure: a MERIT-HF substudy. *Clin Pharmacol Ther.***95**:321–330.
- BERNAL ML, SINUES B, JOHANSSON I, MCLELLAN RA, WENNERHOLM A, DAHL ML, INGELMAN-SUNDBERG M, BERTILSSON L (1999). Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics* **9**:657–660.
- BERTILSSON L, ABERG-WISTEDT A, GUSTAFSSON LL, NORDIN C (1985). Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: a case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit* **7**:478–480.
- BERTZ RJ, GRANNEMAN GR (1997). Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* **32**: 210–58.
- BEVERAGE JN1, SISSUNG TM, SION AM, DANESI R, FIGG WD(2007). CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci* **96**: 2224-31.
- BIJL MJ1, VISSER LE, HOFMAN A, VULTO AG, VAN GELDER T, STRICKER BH, VAN SCHAIK RH(2008). Influence of the CYP2D6*4 polymorphism on dose, switching and discontinuation of antidepressants. *Br J Clin Pharmacol.***65**: 558-64.
- BIJL MJ, VISSER LE, VAN SCHAIK RH, KORS JA, WITTEMAN JC, HOFMAN A, VULTO AG, VAN GELDER T, STRICKER BH(2009). Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther* **85**: 45–50.
- BOCK KW, SCHRENK D, FORSTER A, GRIESE EU, MÖRIKE K, BROCKMEIER D, EICHELBAUM M(1994). The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics* **4**: 209-18.
- Bozina N, Bradamante V, Lovric M (2009). Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* **60**: 217–242.

- BOZKURT A, BASCI NE, ISIMER A, SAYAL A, KAYAALP SO (1996.) Metabolic ratios of four probes of CYP2D6 in Turkish subjects: a cross-over study. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **21**: 309–314.
- BRAUCH H, MÜRDTER T E, EICHELBAUM M & SCHWAB M (2009). Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem* **55**: 1770–1782.
- BROCKMOLLER J, KIRCHHEINER J, SCHMIDER J, WALTER S, SACHSE C, MULLER- OERLINGHAUSEN B, ROOTS I (2002). The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment, *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**: 438–452.
- BROSEN K, SKJELBO E (1991). Fluoxetine and norfluoxetine are potent inhibitors of P450IID6-the source of the sparteine/ debrisoquine oxidation polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*, **32**: 136-7.
- BROWN TA (1993). *Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol. II.* Oxford University Press Inc., New York.
- BRYNNE N, SVANSTROM C, ALBERG-WISTEDT A, HALLEN B, BERTILSSON L (1999). Fluoxetine inhibits the metabolism of tolterodine-pharmacokinetic implications and proposed clinical relevance. *Br J Clin Pharmacol*, **48**: 553-63.
- BU H, ROSDAHL I, SUN ZF & ZHANG H (2007). Importance of polymorphisms in NF- κ B1 and NF- κ B1a genes for melanoma risk, clinicopathological features and tumor progression in Swedish melanoma patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**: 856–866.
- CAI WM, CHEN B AND ZHANG WX (2007). Frequency of CYP2D6*10 and *14 alleles and their influence on the metabolic activity of CYP2D6 in a healthy Chinese population. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**: 95-98.
- CAI WM, NIKOLOFF DM, PAN RM, DE LEON J, FANTI P, FAIRCHILD M, KOCH WH AND WEDLUND PJ (2006). CYP2D6 genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: implications for clinical practice and genetic testing. *Pharmacogenomics J*, **6**: 343-350.
- CANDIOTTI KA1, YANG Z, RODRIGUEZ Y, CRESCIMONE A, SANCHEZ GC, TAKACS P, MEDINA C, ZHANG Y, LIU H, GITLIN MC(2009). The impact of CYP2D6 genetic polymorphisms on postoperative morphine consumption. *Pain Med.* **10**: 799-805.
- CARCILLO JA, ADEDOYIN A, BURCKART GJ, FRYERF, VENKATARAMANANR, KNOLL C, THUMMEL K, ROSKOS L, WILSON JW, SEREIKKA S, ROMKES M, BEBIA Z, BRANCH RA(2003). Coordinated intrahepatic and extrahepatic regulation of cytochrome P4502D6 in healthy subjects and in patients after liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*; **73**: 456-67.

- CARRILLO JA, DAHL ML, SVENSSON JO, ALM C, RODRIGUEZ I, BERTILSSON L (1996). Disposition of fluvoxamine in humans is determined by the polymorphic CYP2D6 and also by the CYP1A2 activity. *Clin Pharmacol Ther* **60**: 183–190.
- CARTWRIGHT AL, WILBY KJ, CORRIGAN S, ENSOM MHH (2013). Pharmacogenetics of risperidone: a systematic review of the clinical effects of CYP2D6 polymorphisms. *Ann Pharmacother*; **47**:350–60.
- CASCORBI I (2003). Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest*, **33**: 17-22.
- CHANG HW, CHENG YH, CHUANG LY, YANG CH(2010). SNP-RFLP ing 2: an updated and integrated PCR- RFLP tool for SNP genotyping. *BMC Bioinformatics*, **8**: 173.
- CHANG HW, CHUANG LY, CHENG YH, HUNG YC, WEN CH, GU DL, YANG CH(2009). Prim-SNPing: a primer designer for cost-effective SNP genotyping. *Biotechniques*, **46**: 421-431.
- CHATTERJEE PD (1999). Direct sequencing of bacterial and P1 artificial chromosome-nested deletions for identifying position-specific single-nucleotide polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13276–13281.
- CHEN X, XIA Y, ALFORD M, DETERESA R, HANSEN L, KLAUBER MR, KATZMAN R, THAL L, MASLIAH E, SAITOH T (1995). The CYP2D6B allele is associated with a milder synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **38**:653-8.
- CHLADEK J, ŽIMOVA G, BERANEK M & MARTĚNKOVA J (2000). In-vivo indices of CYP2D6 activity: Comparison of dextromethorphan metabolic ratios in 4-h urine and 3-h plasma. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **56**: 651–657.
- CHRISTENSEN PM, GOTZSCHE PC, BROSEN K (1998). The sparteine/debrisoquine (CYP2D6) oxidation polymorphism and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenetics*. **8**:473–9.
- COLLER JK, KREBSFAENGER N, KLEIN K, ENDRIZZI K, WOLBOLD R, LANG T, NÜSSLER A, NEUHAUS P, ZANGER UM, EICHELBAUM M, MÜRDTER TE(2002). The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol* **54**: 157–167.
- CREWE HK1, NOTLEY LM, WUNSCH RM, LENNARD MS, GILLAM EM(2002). Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 40-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4- hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* **30**: 869-74.

- CRISAFULLI C, FABBRI C, PORCELLI S, DRAGO A, SPINA E, DE RONCHI D & SERRETTI A (2011). Pharmacogenetics of antidepressants. *Frontiers in Pharmacology*, **2**:60.
- CUPP MJ AND TRACY TS (1998). Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications. *Am. Fam. Physician*, **57**: 107-116.
- POUNDER DJ & JONES GR (1990). Post-mortem drug redistribution - a toxicological nightmare, *Forensic Sci. Int.* **45**: 253-263.
- DAHL ML, JOHANSSON I, BERTILSSON L, INGELMAN-SUNDBERG M, SJOQVIST F (1995). Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:516–520.
- DALEN P, DAHL ML, RUIZ ML, NORDIN J, BERTILSSON L (1998) 10- Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* **63**: 444–452.
- DALY AK, CHOLERTON S, ARMSTRONG M, IDLE JR (1994) Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 102 Suppl **9**: 55-61.
- DALY AK, STEEN VM, FAIRBROTHER KS, IDLE JR (1999). CYP2D6 multiallelism. *Methods Enzymol*, **272**:199-210.
- DARBAR D & RODEN DM (2006). Pharmacogenetics of antiarrhythmic therapy. *Expert Opin Pharmacother* **7**: 1583–1590.
- DAYER P, LEEMANN T, STRIBERNI R (1989). Dextromethorphan O-demethylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P-450 db1 activity. *Clin Pharmacol Ther*, **45**: 34-40.
- DE LEON J, SUSCE MT, JOHNSON M, HARDIN M, MAW L, SHAO A, ALLEN AC, CHIAFARI FA, HILLMAN G, NIKOLOFF DM (2009). DNA Microarray Technology in the Clinical Environment: The AmpliChip CYP450 Test for CYP2D6 and CYP2C19 Genotyping. *CNS Spectr*, **14**:19-34.
- DEHAL SS, KUPFER D (1997). CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res*, **57**: 3402-6.
- DENG Y, NEWMAN B, DUNNE MP, SILBURN PA, MELLICK GD (2004). Further evidence that interactions between CYP2D6 and pesticide exposure increase risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. **55**:897.
- DENG GR (1988). A sensitive non-radioactive PCR- RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res.***16**: 6231.

- DRUMMER OH (2010), Forensic toxicology. *EXS.* **100**:579-603.
- LESSARD E, YESSINE MA, HAMELIN BA, O'HARA G, LEBLANC J, TURGEON J (1999). Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans, *Pharmacogenetics* **9**:435-443.
- EAP CB, BONDOLFI G, ZULLINO D, SAVARY-COSENDI L, POWELL-GOLAY K, KOSEL M, BAUMANN P(2001). Concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine after multiple doses of fluoxetine in cytochrome P4502D6 poor and extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol*, **21**: 330–334.
- ECKHARDT K, LI S, AMMON S, SCHÄNZLE G, MIKUS G, EICHELBAUM M (1998). Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain* **76**: 27–33.
- EICHELBAUM M, BAUR MP, DENGLER HJ, OSIKOWSKA-EVERS BO, TIEVES G, ZEKORN C, RITTNER C(1987). Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol*, **23**: 455-8.
- EICHELBAUM M, GROSS AS (1990). The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-clinical aspects. *Pharmac Ther*; **46**:377-94.
- EICHELBAUM M, MINESHITA S, OHNHAUS EE, ZEKOR C (1986). The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol*, **22**: 49-53.
- EICHELBAUM M, SPANNBRUCKER N, DENGLER HJ (1975). Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 287 Suppl. R94.
- EICHELBAUM M, INGELMAN-SUNDBERG M, EVANS WE. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu. Rev. Med.* **57**: 119–137.
- EICHELBAUM M, SPANNBRUCKER N, STEINCKE B & DENGLER HJ (1979). Defective N-oxidation of sparteine in man: A new pharmacogenetic defect. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **16**: 183–187.
- EIERMANN B, EDLUND PO, TJERNBERG A, DALEN P, DAHL ML, BERTILSSON L (1998). 1- and 3-hydroxylations, in addition to 4-hydroxylation, of debrisoquine are catalyzed by cytochrome P450 2D6 in humans. *Drug Metab Dispos*; **26**: 1096-101.
- ELBAZ A, LEVECQUE C, CLAVEL J, VIDAL JS, RICHARD F, AMOUYEL P, ALPEROVITCH A, CHARTIER-HARLIN MC, TZOURIO C(2004). CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol*.**55**: 430-4.
- EMADI A, CRIM MT, BROTMAN DJ, NECOCHEA AJ, SAMAL L, WILSON LM, BASS EB, SEGAL JB (2010). Analytic validity of genetic tests to identify factor V Leiden and prothrombin G20210A. *Am J Hematol*,**85**: 264-270.

- ERICKSON DA, MATHER G, TRAGER WF, LEVY RH, KEIRNS JJ(1999). Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos*, **27**: 1488-95.
- EVANS WE, RELING MV (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. **286**:487–491.
- EVERT B, EICHELBAUM M, HAUBRUCK H, ZANGER UM(1997). Functional properties of CYP2D6.1 (wild-type) and CYP2D6.7 (His324Pro) expressed by recombinant baculovirus in insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **355**: 309-18.
- FAJARDO V, GONZÁLEZ I, DOOLEY J, GARRET S, BROWN HM, GARCÍA T, MARTÍN R (2009). Application of polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game and domestic meats. *J Sci Food Agric*, **89**:843-847.
- FORS L, LIEDER KW, VAVRA SH & KWIATKOWSKI RW (2000). Large-scale SNP scoring from unamplified genomic DNA. *Pharmacogenomics* **1**: 219–229.
- FRANK D, JAEHDE U & FUHR U (2007). Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **63**: 321–333.
- FULLER RW, SNODDY HD, KRUSHINSKI JH, ROBERTSON DW (1992). Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology*, **31**: 997–1000.
- FUNCK-BRENTANO C, BOËLLE PY, VERSTUYFT C, BORNERT C, BECQUEMONT L & POIRIER JM (2005). Measurement of CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo with dextromethorphan: sources of variability and predictors of adverse effects in 419 healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **61**: 821–829.
- FUX R, MÖRIKE K, PRÖHMER AMT, DELABAR U, SCHWAB M, SCHAEFFELER E, LORENZ G, GLEITER CH, EICHELBAUM M, KIVISTÖ KT (2005). Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* **78**: 378–387.
- GAEDIGK A, BHATHENA A, NDJOUNTCHÉ L, PEARCE RE, ABDEL-RAHMAN SM, ALANDER SW, BRADFORD LD, ROGAN PK, LEEDER JS(2005a). Identification and characterization of novel sequence variations in the cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene in African Americans. *Pharmacogenomics J*, **5**: 173-82.
- GAEDIGK A, BLUM M, GAEDIGK R, EICHELBAUM M, MEYER UA (1991). Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*, **48**: 943-950.

- GAEDIGK A, NDJOUNTCHÉ L, LEEDER JS, BRADFORD LD(2005b). Limited association of the 2988G>A single nucleotide polymorphism with CYP2D6*41 in Black subjects. *Clin Pharmacol Ther*, **77**: 228-30.
- GAEDIGK A, BRADFORD LD, ALANDER SW, LEEDER JS (2006). CYP2D6*36 gene arrangements within the cyp2d6 locus: association of CYP2D6*36 with poor metabolizer status. *Drug Metab Dispos* **34**: 563–569.
- GAEDIGK A, NDJOUNTCHE L, DIVAKARAN K, DIANNE BRADFORD L, ZINEH I, OBERLANDER TF, BROUSSEAU DC, MCCARVER DG, JOHNSON JA, ALANDER SW, WAYNE RIGGS K, STEVEN LEEDER J (2007). Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther* **81**:242–251.
- GAEDIGK A, SIMON SD, PEARCE RE, BRADFORD LD, KENNEDY MJ & LEEDER JS (2008). The CYP2D6 activity score: Translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **83**: 234–242.
- GAEDIGK A, BRADFORD LD, MARCUCCI KA, LEEDER JS (2002). Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther* **72**:76–89.
- GARCIA-BARCELO M, CHOW LY, CHIU HF, WING YK, LEE DT, LAM KL AND WAYE MM (2000). Genetic analysis of the CYP2D6 locus in a Hong Kong Chinese population. *Clin. Chem.* **46**: 18-23.
- GARDINER SJ AND BEGG EJ (2006). Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol. Rev.*, **58**: 521-590.
- GASCHE Y, DAALI Y, FATHI M, CHIAPPE A, COTTINI S, DAYER P, DESMEULES J (2004). Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med* **351**: 2827–2831.
- GELSTON EA, COLLER JK, LOPATKO OV, JAMES HM, SCHMIDT H, WHITE JM, SOMOGYI AA(2012). Methadone inhibits CYP2D6 and UGT2B7/2B4 in vivo: a study using codeine in methadone- and buprenorphine-maintained subjects. *Br J Clin Pharmacol* **73**: 786–794.
- GOETZ MP, KNOX SK, SUMAN VJ, RAE JM, SAFGREN SL, AMES MM, VISSCHER DW, REYNOLDS C, COUCH FJ, LINGLE WL, WEINSHILBOUM RM, FRITCHER EG, NIBBE AM, DESTA Z, NGUYEN A, FLOCKHART DA, PEREZ EA, INGLE JN(2007). The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **101**: 113–121.
- GONZALEZ FJ, MAYER UA (1991). Molecular genetics of the debrisoquine-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* **50**: 233-8.

- GONZALEZ FJ, SKODA RC, KIMURA S, UMENO M, ZANGER UM, NEBERT DW, GELBOIN HV, HARDWICK JP, MEYER UA(1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, **331**: 442-6.
- GOTO A, ADACHI Y, INABA A, NAKAJIMA H, KOBAYASHI H, SAKAI K. (2004). Identification of human p450 isoforms involved in the metabolism of the antiallergic drug, oxatomide, and its inhibitory effect on enzyme activity. *Biol Pharm Bull* **27**:684–690.
- GOUGH AC, MILES JS, SPURR NG, MOSS JE, GAEDIGK A, EICHELBAUM M, WOLF CR (1990). Identification of the prime gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature* **347**: 773-5.
- GOUGH AC, SMITH CA, HOWELL SM, WOLF CR, BRYANT SP, SPURR NK(1993). Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* **15**: 430-2.
- GRIESE EU, ZANGER UM, BRUDERMANN S, GAEDIGK A, MIKUS G, MORIKE K, STÜVEN T, EICHELBAUM M (1998) Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* **8**:15– 26.
- GRIFFIOEN PH, DE JONGE R, VAN ZELST BD, MONTSERRATE BROUNS R, LINDEMANS J (2005). Detection and allele-frequencies of the 833T>C, 844ins68 and a novel mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Clin Chim Acta*,**354**:191-194.
- GUNDERSON KL, STEEMERS FL, LEE G, MENDOZA LG & CHEE MA (2005). genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat. Genet.* **37**: 549–554.
- GURLEY BJ, SWAIN A, HUBBARD MA, WILLIAMS DK, BARONE G, HARTSFIELD F, TONG Y, CARRIER DJ, CHEBOYINA S, BATTU SK (2008). Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and Echinacea. *Mol Nutr Food Res* **52**: 755–763.
- HAFF LA & SMIRNOV IP (1997). Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res.* **7**: 378–388.
- HALL JG, EIS PS, LAW SM, REYNALDO LP, PRUDENT JR, MARSHALL DJ, ALLAWI HT, MAST AL, DAHLBERG JE, KWIATKOWSKI RW, DE ARRUDA M, NERI BP, LYAMICHEV VI (2000). Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:8272–77.

- HALLIDAY RC, JONES BC, SMITH DA, KITTERINGHAM NR, PARK BK (1995). An investigation of the interaction between halofantrine, CYP2D6 and CYP3A4: studies with human liver microsomes and heterologous enzyme expression systems. *Br J Clin Pharmacol*; **40**: 369-78.
- HALLING JN, PETERSEN MS, DAMKIER P, NIELSEN F, GRANDJEAN P, WEIHE PL, BRÅ SEN K (2005). Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **61**: 491–497.
- HANIOKA N, KIMURA S, MEYER UA, GONZALEZ FJ (1990) The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: A G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet* **47**: 994-1001.
- HAUFROID V, HANTSON P (2015). CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clin Toxicol (Phila)* **53**:501–10.
- HEIM M, MEYER UA (1990). Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* **336**: 529-32.
- HEIM MH, MEYER UA (1992). Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* **14**: 49-58.
- HICKS JK, SWEN JJ, THORN CF, SANGKUHL K, KHARASCH ED, ELLINGROD VL, STINGL JC (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **93**: 402–408.
- HIROI T, CHOW T, IMAOKA S, FUNAE Y (2002). Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab Dispos.***30**: 970-6.
- HOGSTEDT S, LINDBERG B, PENG DR, REGARDH CG, RANE A (1985). Pregnancy-induced increase in metoprolol metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **37**:688-92.
- HORN T, CASTILHO L, MOULDS JM, BILLINGSLEY K, VEGE S, JOHNSON N, WESTHOFF CM. (2012). A novel JKA allele, nt561C>A, associated with silencing of Kidd expression. *Transfusion*, **52**:1092-6
- HU OY, TANG HS, LANE HY, CHANG WH & HU TM (1998). Novel single-point plasma or saliva dextromethorphan method for determining CYP2D6 activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **285**: 955–960.
- IMAI T, TAKETANI M, SUZU T, KUSUBE K, OTAGIRI M (1999). In vitro identification of the human cytochrome P-450 enzymes involved in the N-demethylation of azelastine. *Drug Metab Dispos* **27**: 942–946.

- INGELMAN-SUNDBERG M (1999b) Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. *Drug Metab Rev* **31**:449–459.
- INGELMAN-SUNDBERG M, SIM SC, GOMEZ A, RODRIGUEZ-ANTONA C (2007.) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* **116**: 496-526.
- INGELMAN-SUNDBERG M (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* **5**: 6-13.
- INGELMAN-SUNDBERG M (2004). Pharmacogenetics of cytochrome p450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* **25**:193–200.
- INGELMAN-SUNDBERG M & RODRIGUEZ-ANTONA C (2005). Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: Implications for a safer and more effective drug therapy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**: 1563–1570.
- INGELMAN-SUNDBERG, M. & SIM, S.C. (2010). Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**: 90–94.
- INGELMAN-SUNDBERG M, DALY AK, OSCARSON M AND NEBERT DW (2000). Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics*, **10**: 91-93.
- INGELMAN-SUNDBERG M, OSCARSON M AND MCLELLAN RA (1999a). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**: 342-349.
- ISMAIL R AND TEH LK (2001). Genetic polymorphism of CYP2D6: Malaysian Indians have the highest frequency for CYP2D6*4 in Asia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**: 617-618.
- ITO Y, KONDO H, GOLDFARB PS, LEWIS DFV (2008). Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods. *J Mol Graph Model* **26**: 947–56.
- IWASAKI H, EZURA Y, ISHIDA R, KAJITA M, KODAIRA M, KNIGHT J, DANIEL S, SHI M, EMI M (2002). Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res.* **9**: 59–62.
- JACQZ-AIGRAIN E, FUNCK-BRENTANO C, CRESTEIL T (1993). CYP2D6- and CYP3A- dependent metabolism of dextromethorphan in humans. *Pharmacogenetics*; **3**: 197-204.

- JANNETTO PJ AND BRATANOW NC (2010). Pharmacogenomic considerations in the opioid management of pain. *Genome Med.*, **2**: 66.
- JEPPESEN U, GRAM LF, VISTISEN K, LOFT S, POULSEN HE, BROSEN K (1996). Dose dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol* **51**:73-8.
- JIANG L, YIN X, YIN C, ZHOU S, DAN W, SUN X (2011). Different quantitative EEG alterations induced by TBI among patients with different APOE genotypes. *Neurosci Lett*, **505**:160-164.
- JOHANSSON I, LUNDQVIST E, DAHL ML, INGELMAN-SUNDBERG M (1996). PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics* **6**: 351–355.
- JOHANSSON I, LUNDQVIST E, BERTILSSON L, DAHL ML, SJÖQVIST F & INGELMAN-SUNDBERG M (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D6 locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**: 11825–11829.
- JOHANSSON I, OSCARSON M, YUE QY, BERTILSSON L, SJÖQVIST F & INGELMAN-SUNDBERG, M (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: Characterization of variant CYP2D6 genes in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Molecular Pharmacology*, **46**: 452–459.
- JOHNSON MD, ZUO H, LEE KH, TREBLEY JP, RAE JM, WEATHERMAN RV, DESTA Z, FLOCKHART DA, SKAAR TC (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **85**: 151–159.
- JONES BC, HYLAND R, ACKLAND M, TYMAN CA, SMITH DA (1998). Interaction of terfenadine and its primary metabolites with cytochrome P450 2D6. *Drug Metab Dispos* **26**: 875–882.
- JORNIL J, JENSEN KG, LARSEN F, LINNET K (2011). Risk assessment of accidental nortriptyline poisoning: The importance of cytochrome P450 for nortriptyline elimination investigated using a population-based pharmacokinetic simulator. *Eur J Pharm Sci* **44**:265–272.
- JORNIL J, NIELSEN TS, ROSENDAL I, AHLNER J, ZACKRISSON AL, BOEL LW, BROCK B (2013). A poor metabolizer of both CYP2C19 and CYP2D6 identified by mechanistic pharmacokinetic simulation in a fatal drug poisoning case involving venlafaxine. *Forensic Sci Int* **226**: e26–31.
- JURICA J, BARTECEK R, ZOURKOVA A, PINDUROVA E, SULCOVA A, KASPAREK T & ZENDULKA O (2012). Serum dextromethorphan/ dextrorphan metabolic ratio for CYP2D6 phenotyping in clinical practice. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **37**: 486–490.

- KAGIMOTO M, HEIM M, KAGIMOTO K, ZEUGIN T, MEYER UA (1990). Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine: study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem* **265**: 17209-14.
- KALLIO J, LINDBERG R, HUUPPONEN R, IISALO E (1988). Debrisoquine oxidation in a Finnish population: the effect of oral contraceptives on the metabolic ratio. *Br J Clin Pharmacol* **26**: 791-5.
- KASAI S, HAYASHIDA M, SORA I AND IKEDA K (2008). Candidate gene polymorphisms predicting individual sensitivity to opioids. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **377**: 269-281.
- KAHUBA AD, NAFZIGER AN, KEARNS GL, LEEDER JS, SHIREY CS, GOTSCHALL R, GAEDIGK A, BERTINO JS JR (1998). Quantification of intraindividual variability and the influence of menstrual cycle phase on CYP2D6 activity as measured by dextromethorphan phenotyping. *Pharmacogenetics* **8**:403-10.
- KE X, COLLINS A & YE S (2001). PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*, **17**:838- 839, ISSN 1367-4803.
- KIDD KK, RUANO G, (1995). Optimising PCR. In: McPherson MJ, Hames BD, Taylor GR (Eds.). *PCR 2. A Practical Approach*, Oxford University press, New York.
- KIMURA S, UMENO M, SKODA RC, MEYER UA, GONZALEZ FJ (1989). The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* **45**: 889-904.
- KINGBÄCK M, KARLSSON L, ZACKRISSON AL, CARLSSON B, JOSEFSSON M, BENGTSSON F, AHLNER J, KUGELBERG FC (2012). Influence of CYP2D6 genotype on the disposition of the enantiomers of venlafaxine and its major metabolites in post-mortem femoral blood. *Forensic Sci Int* **214**:124–134.
- KIRCHHEINER J, SEERINGER A (2007). Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**: 489-94.
- KIRCHHEINER J, HEESCH C, BAUER S, MEISEL C, SERINGER A, GOLDAMMER M, BROCKMÖLLER J (2004a). Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **76**: 302–312.
- KIRCHHEINER J, HENCKEL HB, FRANKE L, MEINEKE I, TZVETKOV M, UEBELHACK R, BROCKMÖLLER J (2005). Impact of the CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype on doxepin pharmacokinetics and serotonin in platelets. *Pharmacogenetics and Genomics*, **15**: 579–587.

- KIRCHHEINER J, HENCKEL HB, MEINEKE I, ROOTS I & BROCKMÖLLER J (2004b). Impact of the CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype on mirtazapine pharmacokinetics and adverse events in healthy volunteers. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **24**: 647–652.
- KIRCHHEINER J, SCHMIDT H, TZVETKOV M, KEULEN JT, LÖTSCH J, ROOTS I & BROCKMÖLLER, J (2007). Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultrarapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics Journal*, **4**: 257–265.
- KISHIMOTO W, HIROI T, SAKAI K, FUNAE Y, IGARASHI T (1997). Metabolism of epinastine, a histamine H1 receptor antagonist, in human liver microsomes in comparison with that of terfenadine. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **98**: 273–292.
- KITADA M. (2003). Genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes in Asian populations: Focus on CYP2D6. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, **23**: 31–35.
- KLOTZ U. (2007). Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* **46**: 985–996.
- KOREN G, CAIRNS J, CHITAYAT D, GAEDIGK A & LEEDER SJ (2006). Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet* **368**: 704.
- KOSARAC B, FOX AA AND COLLARD CD (2009). Effect of genetic factors on opioid action. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **22**: 476-482.
- KOSKI A, OJANPERA I, SISTONEN J, VUORI E, SAJANTILA A (2007). A fatal doxepin poisoning associated with a defective CYP2D6 genotype. *Am J Forensic Med Pathol* **28**: 259–261.
- KOSKI A, SISTONEN J, OJANPERA I, GERGOV M, VUORI E, SAJANTILA A (2006). CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and amitriptyline metabolite ratios in a series of medicolegal autopsies. *Forensic Sci Int* **158**:177–183.
- KROEMER HK, EICHELBAUM M (1995). “It’s the genes, stupid” molecular basis and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sc*; **56**: 2285-98.
- KROEMER HK, MIKUS G, KRONBACH T, MAYER UA, EICHELBAUM M (1989). In vitro characterisation of the human cytochrome P450 involved in the polymorphic oxidation of propofenone. *Clin Pharmacol Ther* **45**:28-33.
- KUBOTA T, YAMAURA Y, OHKAWA N, HARA H AND CHIBA K ((2000). Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of

- dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **50**: 31-34.
- KUDO S, OKUMURA H, MIYAMOTO G, ISHIZAKI T (1999). Cytochrome P-450 isoforms involved in carboxylic acid ester cleavage of Hantzsch pyridine ester of pranidipine. *Drug Metab Dispos* **27**: 303-8.
- KUMAR GN, RODRIGUES AD, BUKO AM, DENISSEN JF (1996). Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **277**: 423-31.
- KWIATKOWSKI RW, LYAMICHEV V, DE ARRUDA M & NERI B (1999). Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the invader assay. *Mol. Diag.* **4**: 353-364.
- KWOK P-Y, CHEN X (1998). Detection of single nucleotide polymorphisms. In *Genetic Engineering, Principles and Methods*, ed. JK Setlow. New York: Plenum. **20**:125-34.
- KWOK P-Y (2000). High-throughput genotyping assay approaches. *Pharmacogenomics* **1**: 95-100.
- KWOK PY (2001). Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **2**: 235-58.
- LAINE K, TYBRING G, HÄRTTER S, ANDERSSON K, SVENSSON JO, WIDÉN J, BERTILSSON L (2001). Inhibition of cytochrome P4502D6 activity with paroxetine normalizes the ultrarapid metabolizer phenotype as measured by nortriptyline pharmacokinetics and the debrisoquin test. *Clin Pharmacol Ther* **70**: 327-335.
- LAM YW, GAEDIGK A, ERESHEFSKY L, ALFARO CL, SIMPSON J (2002). CYP2D6 inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors: analysis of achievable steady-state plasma concentrations and the effect of ultrarapid metabolism at CYP2D6. *Pharmacotherapy* **22**: 1001-1006.
- LANGFORD NJ, MARTÍN U, RUPRAH M, FERNER RE (2002). Alternative venlafaxine kinetics in overdose. *J Clin Pharm Ther* **27**:465-467.
- LEE JCI & CHANG JG (1992). ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.* **37**: 1269-1275.
- LEE SY, SOHN KM, RYU JY, YOON YR, SHIN JG AND KIM JW (2006). Sequence-based CYP2D6 genotyping in the Korean population. *Ther. Drug. Monit.* **28**: 382-387.
- LEE SJ, LEE SS, JUNG HJ, KIM HS, PARK SJ, YEO CW & SHIN JG (2009). Discovery of novel functional variants and extensive evaluation of CYP2D6 genetic polymorphisms in Koreans. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**: 1464-1470.

- LEEDER JS, PEARCE RE, GAEDIGK A, MODAK A & ROSEN DI (2008). Evaluation of a [¹³C]-dextromethorphan breath test to assess CYP2D6 phenotype. *Journal of Clinical Pharmacology*, **48**: 1041–1051.
- LENNARD MS, SILAS JH, TREVETHIK J (1982). Defective metabolism of metoprolol in poor hydroxylators of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol* **14**: 301-3.
- LENNARD MS (1990). Genetic polymorphism of sparteine/debrisoquine oxidation: A reappraisal. *Pharmacol Toxicol* **67**:273-83.
- LEPPERT, W. (2011). CYP2D6 in the metabolism of opioids for mild to moderate pain. *Pharmacology*, **87**: 274–285.
- LESSARD E, YESSINE MA, HAMELIN BA, O'HARA G, LEBLANC J, TURGEON J (1999). Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics* **9**:435–443.
- LEVKOVICH NN, GOROVENKO NG, MYASOEDOV DV (2011). Association of polymorphic G1934A variant (allele *4) of CYP2D6 gene with increased risk of breast cancer development in Ukrainian women. *Exp Oncol*. **33**:136-9.
- LEWIS DFV, LAKE BG & DICKINS M (2004). Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism. *Drug Metabol Drug Interact* **20**: 111–142.
- LIMA-NETO LG, HIRATA RD, LUCHESSI AD, SILBIGER VN, PASTORELLI CP, SAMPAIO MF, ARMAGANIJAN D, REZENDE AA, DOI SQ, HIRATA MH (2009). Detection of the TLR4 1196C>T polymorphism by mismatched-polymerase chain reaction using plasmid DNA as internal control in restriction fragment length polymorphism assays. *Genet Test Mol Biomarkers*, **13**: 343-347.
- LINDER MW, PROUGH RA, VALDES R JR (1997). Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*, **43**:254-66.
- LIOU YH, LIN CT, WU YJ AND WU LS (2006). The high prevalence of the poor and ultrarapid metabolite alleles of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and CYP3A5 in Taiwanese population. *J. Hum. Genet.* **51**: 857-863.
- LIVAK KJ (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* **14**: 143–149.
- LIVAK KJ, FLOOD SJ, MARMARO J, GIUSTI W & DEETZ K (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**: 357–362.

- LIZARDI P, HUANG X, ZHU Z, BRAY-WARD P, THOMAS D WARD, D (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat. Genet.*, **19**: 225 – 232.
- LLERENA A, DORADO P & PENAS-LLEDO EM (2009). Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics*, **10**: 17–28.
- LOPEZ M, GUERRERO J, JUNG-COOK H AND ALONSO ME (2005). CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **61**: 749-754.
- LOTSCH J AND GEISSLINGER G (2006). Current evidence for a genetic modulation of the response to analgesics. *Pain*, **121**: 1-5.
- LOTSCH J, SKARKE C, LIEFHOLD J AND GEISSLINGER G (2004). Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives. *Clin. Pharmacokinet.* **43**: 983-1013.
- LOVE-GREGORY LD, DYER JA, GRASELA J, HILLMAN RE & PHILLIPS CL (2001). Carrier detection and rapid newborn diagnostic test for the common Y393N maple syrup urine disease allele by PCR- RFLP: culturally permissible testing in the Mennonite community. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**: 393–403.
- LU Y, MO C, ZENG Z, CHEN S, XIE Y, PENG Q, HE Y, DENG Y, WANG J, XIE L, ZENG J, LI S, QIN X (2013). CYP2D6*4 allele polymorphism increases the risk of Parkinson's disease: evidence from meta-analysis. *PLoS One.* **8**: 2–10.
- LUO HR, GAEDIGK A, ALOUMANIS V AND WAN YJ (2005). Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **61**: 797-802.
- MADADI P, AVARD D & KOREN G (2012). Pharmacogenetics of opioids for the treatment of acute maternal pain during pregnancy and lactation. *Curr Drug Metab* **13**: 721–727.
- MADADI P, ROSS CJ, HAYDEN MR, CARLETON BC, GAEDIGK A, LEEDER JS, KOREN G (2009). Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine during breastfeeding: a case–control study. *Clin Pharmacol Ther* **85**: 31–35.
- MARECHAL JD, KEMP CA, ROBERTS GC, PAÏNE MJ, WOLF CR, SUTCLIFFE MJ (2008). Insights into drug metabolism by cytochromes P450 from modelling studies of CYP2D6-drug interactions. *Br J Pharmacol* **153** Suppl. **1**: S82-9.
- MAREZ D, LEGRAND M, SABBAGH N, LO GUIDICE JM, SPIRE C, LAFITTE JJ, MEYER UA, BROLY F (1997). Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6

gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* **7**: 193-202.

MASIMIREMBWA CM AND HASLER JA (1997). Genetic polymorphism of drug metabolising enzymes in African populations: implications for the use of neuroleptics and antidepressants. *Brain Res. Bull.*, **44**: 561-571.

MATSUMOTO S, YAMAZOE Y (2001). Involvement of multiple human cytochromes P450 in the liver microsomal metabolism of astemizole and a comparison with terfenadine. *Br J Clin Pharmacol* **51**:133–142.

MATSUNAGA T, NAGATA K, HOLSZTYNSKA EJ, LAPENSON DP, SMITH A, KATO R, GELBOIN HV, WAXMAN DJ, GONZALEZ FJ (1988). Gene conversion and differential regulation in the rat P-450 IIA gene subfamily. *J Biol Chem* **263**: 17995-8002.

MCALPINE DE, BIERNACKA JM, MRAZEK DA, O'KANE DJ, STEVENS SR, LANGMAN LJ, COURSON VL, BHAGIA J, MOYER TP (2011). Effect of cytochrome P450 enzyme polymorphisms on pharmacokinetics of venlafaxine. *Ther Drug Monit* **33**:14–20.

MCLELLAN RA, OSCARSON M, SEIDEGARD J, EVANS DA, INGELMAN-SUNDBERG M (1997). Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* **7**:187–191.

MCPHERSON MJ, HAMES BD, TAYLOR GR (Eds) (1995). *PCR 2. A Practical Approach*, Oxford University press, New York.

MCPHERSON MJ, QUIRKE P, TAYLOR GR (Eds.) (1991). *PCR. A Practical Approach*, Oxford University press, New York.

MEYER UA (1990). Genetic polymorphisms of drug metabolism. *Fundam Clin. Pharmacol*, **4**: 595-615.

MİTTAL B, TULSYAN S, KUMAR S, MİTTAL RD, AGARWAL G (2015). Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. *Adv Clin Chem*.**71**:77-139.

MONTANE JAIME LK, LALLA A, STEIMER W AND GAEDIGK A. (2013). Characterization of the CYP2D6 gene locus and metabolic activity in Indo- and Afro-Trinidadians: discovery of novel allelic variants. *Pharmacogenomics*, **14**: 261-276.

MORA J, PUIG P, BOADAS J, URGELL E, MONTSERRAT E, LERMA E, GONZÁLEZ-SASTRE F, LLUÍS F, FARRÉ A, CAPELLÁ G (1998). K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem*, **44**: 2243- 2248.

MÖRIKE K, KIVISTÖ KT, SCHAEFFELER E, JÄGLE C, IGEL S, DRESCHER S, FUX R, MARX C, HOFMANN U, ENGEL C, WAGNER F, DELABAR U, MEISNER

- C, BAIL D, BÖHM JO, GLEITER CH, ZIEMER G, REIN JG, HELLBERG KD, EICHELBAUM M, SCHWAB M (2008). Propafenone for the prevention of atrial tachyarrhythmias after cardiac surgery: a randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Clin Pharmacol Ther* **84**:104–110.
- MURALIDHARAN G, HAWES EM, MCKAY G, KORCHINSKI ED, MIDHA KK (1991). Quinidine but not quinine inhibits in man the oxidative metabolic routes of methoxyphenamine which involve debrisoquine 4-hydroxylase. *Eur J Clin Pharmacol*, **41**:471-4.
- MURATORI L, PAROLA M, RIPALTI A, ROBINO G, MURATORI P, BELLOMO G, CARINI R, LENZI M, LANDINI MP, ALBANO E, BIANCHI FB (2000) Liver / kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut*. **46**: 553-561.
- MÜRDTER TE, SCHROTH W, BACCHUS-GERYBADZE L, WINTER S, HEINKELE G, SIMON W, FASCHING PA, FEHM T; GERMAN TAMOXIFEN AND AI CLINICIANS GROUP, EICHELBAUM M, SCHWAB M, BRAUCH H (2011). Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther* **89**: 708–717.
- MYRAND SP, SEKIGUCHI K, MAN MZ, LIN X, TZENG RY, TENG CH, WILNER KD (2008). Pharmacokinetics/ genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first- and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **84**: 347–361.
- NAKAJIMA M, NAKAMURA S, TOKUDOME S, SHIMADA N, YAMAZAKI H, YOKOI T (1999). Azelastine N-demethylation by cytochrome P-450 (CYP)3A4, CYP2D6, and CYP1A2 in human liver microsomes: evaluation of approach to predict the contribution of multiple CYPs. *Drug Metab Dispos* **27**:1381–1391.
- NAKAMURA K, YOKOI T, KODAMA T, INOUE K, NAGASHIMA K, SHIMADA N, SHIMIZU T, KAMATAKI T (1998). Oxidation of histamine H1 antagonist mequitazine is catalyzed by cytochrome P450 2D6 in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **284**:437–442.
- NARIMATSU S, KARIYA S, ISOZAKI S, OHMORI S, KITADA M, HOSOKAWA S, MASUBUCHI Y, SUZUKI T (1993). Involvement of CYP2D6 in oxidative metabolism of cinnarizine and flunarizine in human liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 1262-8.
- NAVEEN AT, ADITHAN C, SOYA SS, GERARD N AND KRISHNAMOORTHY R (2006). CYP2D6 genetic polymorphism in South Indian populations. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1655-1658.
- NEBERT DW, GONZALEZ FJ. P450 GENES, STRUCTURE, EVOLUTION AND REGULATION (1987). *Annu Rev Biochem* **56**: 933-45.

- NEBERT DW, JONES JE (1989). Regulation of the mammalian cytochrome P-450 (CYP1A1) gene. *Int J Biochem*; **21**: 243- 52.
- NEBERT DW, NELSON DR, COON MJ, ESTABROOK RW, FEYEREISEN R, FUJII-KURIYAMA Y, GONZALEZ FJ, GUENGERICH FP, GUNSALUS IC, JOHNSON EF, LOPER JC, SATO R, WATERMAN MR, WAXMAN DJ (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* **10**: 1–14.
- NEBERT DW, RUSSELL DW (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**: 1155-62.
- NEED AC, MOTULSKY AG, AND GOLDSTEIN DB (2005). Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat. Genet.* **37**: 671–681.
- NELSON DR, KAMATAKI T, WAXMAN DJ, GUENGERICH FP, ESTABROOK RW, FEYEREISEN R, GONZALEZ FJ, COON MJ, GUNSALUS IC, GOTOH O, OKUDA K, NEBERT DW (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**: 1–51.
- NELSON DR (1998). Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol* **107**: 15–24.
- NEWTON CR, GRAHAM A, HEPTINSTALL LE, POWELL SJ, SUMMERS C, KALSHEKER N, SMITH JC, MARKHAM AF (1980). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, **17**: 2503 – 2516.
- NIELSEN C, BARINGTON T, HUSBY S, LILLEVANG ST (2007). Expression of human PTPN22 alleles. *Genes Immun*, **8**: 131-137, ISSN 1466-4879.
- NIEWIŃSKI P, ORZECZOWSKA-JUZWENKO K, HURKACZ M, RZEMIŚLAWSKA Z, JAZWIŃSKA- TARNAWSKA E, MIŁEJSKI P AND FORKASIEWICZ Z (2002). CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **58**: 533- 535.
- NISHIDA Y, FUKUDA T, YAMAMOTO I AND AZUMA J (2000). CYP2D6 genotypes in a Japanese population: low frequencies of CYP2D6 gene duplication but high frequency of CYP2D6*10. *Pharmacogenetics*, **10**: 567-570.
- NIU T & HU Z (2004). SNPicker: a graphical tool for primer picking in designing mutagenic endonuclease restriction assay. *Bioinformatics*, **20**:3263-3265.
- DRUMMER OH (2007). Post-mortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* **165**: 199-203.
- O'MEARA D, AHMADIAN A, ODEBERG J & LUNDEBERG J (2002). SNP typing by apyrase- mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **30**: e75.

- ORTIZ DE MONTELLANO PR (1995). The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **23**: 1181–7.
- OSCARSON M, HIDESTRAND M, JOHANSSON I & INGELMAN-SUNDBERG M (1997). A combination of mutations in the CYP2D6 *17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Molecular Pharmacology*, **32**: 1034–1040.
- OSIKOWSKA-EVERS B, DAYER P, MEYER UA, ROBERTZ GM, EICHELBAUM M (1987). Evidence for altered catalytic properties of the cytochrome P-450 involved in sparteine oxidation in poor metabolizers. *Clin Pharmacol Ther*; **41**: 320-5.
- OTA M, SEKI T, NOMURA N, SUGIMURA K, MIZUKI N, FUKUSHIMA H, TSUJI K, INOKO H (1991). Modified PCR- RFLP method for HLA-DPB1 and -DQA1 genotyping. *Tissue Antigens* **38**: 60–71.
- OTA M, SEKI T, FUKUSHIMA H, TSUJI K & INOKO H (1992). HLA-DRB1 genotyping by modified PCR- RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* **39**: 187–202.
- PAAR WD, POCHE S, GERLOFF J, DENGLER HJ (1997). Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol* **53**: 235-9.
- PAPP AC, PINSONNEAULT JK, COOKE G & SADEE W (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques* **34**: 1068–1072.
- PAUL E, END-RODRIGUES T, THYLEN P AND BERGMAN U (2008). Adverse drug reactions a common cause of hospitalization of the elderly. A clinical retrospective study. *Lakartidningen* **105**: 2338–2342.
- PETSALO A, TURPEINEN M, PELKONEN O, TOLONEN A (2008). Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing sub 2µm particle size column. *J Chromatogr A*. **1215**:107-15.
- PICHARD L, GILLET G, BONFILS C, DOMERGUE J, THÉNOT JP, MAUREL P (1995). Oxidative metabolism of zolpidem by human liver cytochrome P450s. *Drug Metab Dispos* **23**: 1253-62.
- PICKERING, J (2002). Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. **30**: e60.
- PLESNIČAR BK, ZALAR B, BRESKVAR K AND DOLZAN V (2006). The influence of the CYP2D6 polymorphism on psychopathological and extrapyramidal symptoms in the patients on long-term antipsychotic treatment. *J. Psychopharmacol.*, **20**: 829-833.

- POSTLIND H, DANIELSONA, LINDGREN A, ANDERSSON SH (1998). Tolterodine, a new muscarinic receptor antagonist, is metabolized by cytochromes P450 2D6 and 3A in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **26**: 289-93.
- PREISSNER SC, HOFFMANN MF, PREISSNER R, DUNKEL M, GEWIESS A, PREISSNER S (2013). Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One*. **8**:1-12.
- QIN S, SHEN L, ZHANG A, XIE J, SHEN W, CHEN L, XING Q (2008). Systematic polymorphism analysis of the CYP2D6 gene in four different geographical Han populations in mainland China. *Genomics*, **92**: 152-158.
- FERNER RE (2008). Post-mortem clinical pharmacology, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **66**: 430-443.
- RAIMUNDO S, FISCHER J, EICHELBAUM M, GRIESE EU, SCHWAB M, ZANGER UM (2000). Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* **10**: 577-81.
- RASMUSSEN HB (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR- RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*. Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978- 953-51-0458-2.
- RAU T, HEIDE R, BERGMANN K, WUTTKE H, WERNER U, FEIFEL N, ESCHENHAGEN T (2002). Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* **12**:465-472.
- RAU T, WUTTKE H, MICHELS LM, WERNER U, BERGMANN K, KREFT M, FROMM MF, ESCHENHAGEN T (2009). Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther* **85**: 269-272.
- RENDIC S, DI CARLO FJ (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* **29**: 413-580.
- ROJAS M, GONZÁLEZ I, FAJARDO V, MARTÍN I, HERNÁNDEZ PE, GARCÍA T, MARTÍN R (2009). Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poult Sci*, **88**: 669-679.
- ROLLASON V, SAMER C, PIGUET V, DAYER P AND DESMEULES J (2008). Pharmacogenetics of analgesics: toward the individualization of prescription. *Pharmacogenomics*, **9**: 905-933.

- ROSENBERG NA, MAHAJAN S, RAMACHANDRAN S, ZHAO C, PRITCHARD JK & FELDMAN MW (2005). Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *Public Library of Science Genetics*, **1**: e70.
- ROWLAND P, BLANEY FE, SMYTH M G, JONES JJ, LEYDON VR, OXBROW AK, LEWIS CJ, TENNANT MG, MODI S, EGGLESTON DS, CHENERY RJ, BRIDGES AM (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem* **281**:7614–7622.
- SACHSE C, BROCKMOLLER J, BAUER S, ROOTS I (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* **60**:284 – 295.
- SAIKI R, GELFLAND D, STOFFEL S, SCHARF S, HIGUCHI R, HORN G, MULLIS K, ERLICH H (1988). Primer- directed enzymatic amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**:4877-4891.
- SAINI M, DAS DK, DHARA A, SWARUP D, YADAV MP, GUPTA PK (2007). Characterisation of peacock (*Pavocristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. *Br Poult Sci*, **48**: 162-166.
- SAKUYAMA K, SASAKI T, UJIE S, OBATA K, MIZUGAKI M, ISHIKAWA M, HIRATSUKA M (2008). Functional characterization of 17 CYP2D6 allelic variants (CYP2D6.2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). *Drug Metab Dispos*. **36**: 2460–2467.
- SALLEE FR, DEVANE CL, FERRELL RE (2000). Fluoxetine-related death in a child with cytochrome P-450 2D6 genetic de ciency. *J Child Adolesc Psychopharmacol* **10**:27–34.
- SANKAR S, RAMAMURTHY M, NANDAGOPAL B, SRIDHARAN G (2011). An appraisal of PCR-based technology in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Diagn Ther*, **15**:1-11, ISSN 1177-1062.
- SCHMID B, BIRCHER J, PREISIG R, KÜPFER A (1985). Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* **38**: 618-24.
- SCHROTH W, ANTONIADOU L, FRITZ P, SCHWAB M, MUERDTER T, ZANGER UM, SIMON W, EICHELBAUM M, BRAUCH H (2007). Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* **25**:5187–5193.
- SCORDO MG, CAPUTI AP, D'ARRIGO C, FAVA G AND SPINA E (2004). Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol. Res.*, **50**: 195-200.

- SCORDO MG, SPINA E, FACCIOLA G, AVENOSO A, JOHANSSON I DAHL ML (1999). Cytochrome P450 2D6 genotype and steady- state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. *Psychopharmacology (Berl)* **147**:300–305.
- SHAMS ME, ARNETH B, HIEMKE C, DRAGICEVIC A, MÜLLER MJ, KAISER R, LACKNER K, HÄRTTER S (2006). CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* **31**:493–502.
- SHAW KD, AMSTUTZ U, JIMENEZ-MENDEZ R, ROSS CJ, CARLETON BC (2012). Suspected opioid overdose case resolved by CYP2D6 genotyping. *Ther Drug Monit* **34**:121–123.
- SIEGLE I, FRITZ P, ECKHARDT K, ZANGER UM AND EICHELBAUM M (2001). Cellular localization and regional distribution of CYP2D6 mRNA and protein expression in human brain. *Pharmacogenetics*, **11**: 237-245.
- SIMSEK M, AL-WARDY N, AL-KHAYAT A & AL-KHABORY M (2002). A PCR-RFLP test for simultaneous detection of two single-nucleotide insertions in the Connexin-26 gene promoter. *Genet. Test.* **6**: 225–228.
- SINDRUP SH, BRØSEN K, GRAM LF (1992). Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine: nonlinearity and relation to the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* **1**: 288–295.
- SINDRUP SH, POULSEN L, BROSEN K, ARENDT-NIELSEN L AND GRAM LF (1993). Are poor metabolisers of sparteine/debrisoquine less pain tolerant than extensive metabolisers? *Pain*, **53**: 335-339.
- SINVILLE R. & SOPER SA (2007). High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. *J Sep Sci*, **30**:1714-1728, ISSN 1615-9306.
- SISTONEN J, SAJANTILA A, LAO O, CORANDER J, BARBUJANI G & FUSELLI S (2007). CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenetics and Genomics*, **17**: 93–101.
- SMITH DA, JONES BC (1992). Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol*, **44**:2089-98.
- SMITH JC, CURRY SC (2011). Prolonged toxicity after amitriptyline overdose in a patient deficient in CYP2D6 activity. *J Med Toxicol*, **7**:220–223.
- SPALDIN V, MADDEN S, POOL WF, WOOLF TF, PARK BK (1994). The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol*, **38**: 15-22.
- SPIGSET O, GRANBERG K, HAGG S, NORSTROM A, DAHLQVIST R (1997). Relationship between fluvoxamine pharmacokinetics and CYP2D6/CYP2C19 phenotype polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol*, **52**: 129–133.

- SPIGSET O, GRANBERG K, HAGG S, SODERSTROM E, DAHLQVIST R (1998). Non-linear fluvoxamine disposition. *Br J Clin Pharmacol*, **45**: 257–263.
- STAMER UM, ZHANG L AND STUBER F (2010). Personalized therapy in pain management: where do we stand? *Pharmacogenomics*, **11**: 843-864.
- STEEN VM, ANDREASSEN OA, DALY AK, TEFRE T, BØRRESEN AL, IDLE JR, GULBRANDSEN AK (1995). Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6 (D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*, **5**: 215-23.
- STEINER E, BERTILSSON L, SAWE J, BERTLING I, SJOQVIST F (1988). Polymorphic debrisoquin hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin Pharmacol Ther* **44**:431–435.
- STEINER E, ISELIUS L, ALVAN G, LINDSTEN J, SJOQVIST F (1985). A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquin. *Clin Pharmacol Ther* **38**:394–401.
- STELLWAGEN, NC. & STELLWAGEN, E (2009). Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. *J Chromatogr A*, **1216**: 1917-1929, ISSN 0021- 9673.
- STROB GR, VON KRUEDENER JS, STOCKIGT J, GUENGERICH FP, WOLFFT T (1993). Development of a pharmacophore for inhibition of human liver cytochrome P-450 2D6: molecular modeling and inhibition studies. *J Med Chem* 1136–45.
- SUBRAHMANYAM V, RENWICK AB, WALTERS DG, YOUNG PJ, PRICE RJ, TONELLI AP, LAKE BG (2001). Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, **29**: 1146-55.
- SYVALAHTI EK, LINDBERG R, KALLIO J, DE VOCHT M (1986). Inhibitory effects of neuroleptics on debrisoquine oxidation in man. *Br J Clin Pharmacol* **22**:89–92.
- SYVANEN AC (2001). Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet*, **2**:930 – 942.
- SYVANEN AC (1999). From gels to chips: “Minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutat*. **13**:16.
- SZANTAI E, RONAI Z, SASVARI-SZEKELY M, BONN G, GUTTMAN A (2006). Multicapillary electrophoresis analysis of single-nucleotide sequence variations in the deoxycytidine kinase gene. *Clin Chem*, **52**: 1756-1762, ISSN 0009-9147.
- TAMMINGA W J, WEMER J, OOSTERHUIS B, DE BOER A, VRANCKX S, DRENTH BF, DE ZEEUW RA, DE LEIJ LF AND JONKMAN JH (2003). Polymorphic drug metabolism (CYP2D6) and utilisation of psychotropic drugs in hospitalised psychiatric patients: a retrospective study. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. **59**: 57-64.

- TATEISHI T, CHIDA M, ARIYOSHI N, MIZOROGI Y, KAMATAKI T, KOBAYASHI S (1999). Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin Pharmacol Ther.* **65**:570-5.
- TEH LK, ISMAIL R, YUSOFF R, HUSSEIN A, ISA MN AND RAHMAN AR (2001). Heterogeneity of the CYP2D6 gene among Malays in Malaysia. *J. Clin. Pharm. Ther.* **26**: 205-211.
- TEH LK, MOHAMED NI, SALLEH MZ, ROHAIZAK M, SHAHRUN NS, SALADINA JJ, SHIA JK, ROSLAN H, SOOD S, RAJOO TS, MUNIANDY SP, HENRY G, NGOW HA, HLA U KT, DIN J (2012b). The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J.* **14**: 52-59.
- TEH LK & BERTILSSON L (2012a). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **27**: 55–67.
- The Free Dictionary (2012). <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/> (accessed 2018 March 10).
- THEOPHILUS NAA, CHANDRASEKARAN AD, OYA S, SAM S, ERARD NG (2006). CYP2D6 Genetic polymorphism in South Indian populations. *Biol Pharm Bull.* **29**: 2–5.
- TOMALIK-SCHARTE D, LAZAR A, FUHR U, KIRCHHEINER J (2008). The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics J.* **8**: 4-15.
- TOPIĆ E, STEFANOVIC M, IVANISEVIC AM, BLAZINIC F, CULAV J AND SKOCILIC Z (2000). CYP2D6 genotyping in patients on psychoactive drug therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**: 921-927.
- TWYMAN RM (2005). Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping techniques-an overview. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc. pp. 1202–1207.
- TWYMAN RM, PRIMROSE SB (2003). Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics*, **4**: 67 – 79.
- VON AHSEN N, TZVETKOV M, KARUNAJEEWA HA, GOMORRAI S, URA A, BROCKMÖLLER J, OELLERICH M (2010). CYP2D6 and CYP2C19 in Papua New Guinea: High frequency of previously uncharacterized CYP2D6 alleles and heterozygote excess. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, **1**: 310–319.
- VOORMAN RL, MAIO SM, HAUER MJ, SANDERS PE, PAYNE NA, ACKLAND MJ (1998). Metabolism of delavirdine, a human immunodeficiency virus type-1 reverse

transcriptase inhibitor, by microsomal cytochrome P450 in humans, rats, and other species: probable involvement of CYP2D6 and CYP3A. *Drug Metab Dispos* **26**: 631-9.

WANDELIUS M, DARJ E, FRENNE G, RANE A (1997). Induction of CYP- 2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther*, **62**:400-7.

WENNERHOLM A, DANDARA C, SAYI J, SVENSSON JO, ABDI YA, INGELMAN-SUNDBERG M, GUSTAFSSON LL (2002). The African-specific CYP2D6 * 17 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **71**: 77-88.

WOLF CR, SMITH G (1999). Cytochrome P450 CYP2D6. *IARC Sci Publ*, **148**:209-29.

WOOLHOUSE NM, ANDOH B, MAHGOUB A, SLOAN TP, IDLE JR, SMITH RL (1979). Debrisoquin hydroxylation polymorphism among Ghanaians and Caucasians. *Clin Pharmacol Ther*. **26**: 584-91.

WUTTKE H, RAU T, HEIDE R, BERGMANN K, BOHM M, WEIL J, WERNER D, ESCHENHAGEN T (2002). Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects, *Clin. Pharmacol. Ther*. **72**: 429-437.

YUE QY, SVENSSON JO, ALM C, SJOQVIST F, SAWE J (1989). Codeine o-demethylation co-segregates with polymorphic debrisoquine hydroxylation. *Br J Clin Pharmac*, **28**: 639-45.

YUMIBE N, HUIE K, CHEN KJ, CLEMENT RP, CAYEN MN (1995). Identification of human liver cytochrome P450s involved in the microsomal metabolism of the antihistaminic drug loratadine. *Int Arch Allergy Immunol* **107**:420.

ZAHARI Z, SALLEH MR, TEH LK AND ISMAIL R (2009). Influence of CYP2D6 polymorphisms on symptomatology and side-effects of patients with schizophrenia in Malaysia. *Malays. J. Med. Sci*. **16**: 12-20.

ZANGER UM, RAIMUNDO S, EICHELBAUM M (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **369**: 23-37.

ZANGER UM & SCHWAB M (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, **138**: 103-141.

ZANGER UM, TURPEINEN M, KLEIN K & SCHWAB M (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**: 1093-1108.

ZHANG R, ZHU Z, ZHU H, NGUYEN T, YAO F, XIA K, LIANG D, LIU C (2005). SNP cutter: a comprehensive tool for SNP PCR- RFLP assay design. *Nucleic Acids Res.* **33**: W489–W492.

ZHOU SF, DI YM, CHAN E, DU YM, CHOW VD, XUE CC, LAI X, WANG JC, LI CG, TIAN M, DUAN W (2008). Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab*, **9**: 738-84.

ZHOU SF, LIU JP, CHOWBAY B (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*, **41**: 89-295.

ZHU W, CADET P, BAGGERMAN G, MANTIONE KJ AND STEFANO GB (2005). Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J. Immunol.*, **175**: 7357-7362.



ÖZGEÇMİŞ

I - Bireysel Bilgiler

Adı: GULİBAHAER

Soyadı: REJİEPU

Uyruğu: Çin

Medeni Durumu: Bekar

II - Eğitim

Eylül 2014 --- Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Bölümü, Yüksek Lisans Programı, Türkiye.

Eylül 2013 --- Temmuz 2014, Ankara Üniversitesi Dil Okulu, Türkçe Dil programı, Türkiye.

Eylül 2007 - Temmuz 2013, Xin Jiang Tıp Üniversitesi, Temel Tıp Fakültesi, Adli Tıp bölümü, lisans programı, Çin.

Yabancı Dili: Çince, İngilizce, Türkçe, Temel Arapça

III - Bilimsel Etkinlikler

“The Toxic Effects of Arsenic on The Hematopoietic System” konulu yüksek lisans Seminer, 2016

China, as the “world’s factory”, is suffering from serious environmental problems in terms of Environmental Toxicology. Sunum. İkinci Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi, 2016. Ankara, Türkiye.

“The Toxic Effects of Arsenic on The Hematopoietic System” konulu Poster, İkinci Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi, 2016. Ankara, Türkiye.