

Přednáška F1SB1 (27. 4. 2023)

Kódování proteinů a mutace (aneb vybrané související analýzy DNA, RNA a proteinu v praxi)

Josef Skopalík



!! DOMÁCÍ ÚKOL – za extra body ke zkoušce !!

Je zadán na konci této prezentace

- Odevzdání možné 11.5. na přednášce
nebo do 15.5. v IS.MUNI

(využijte prezentace z různých týdnů)

- O čem to dnes bude:
 - A) Úvod - opakování o DNA a RNA kódu
 - B) První analytická metoda – PCR
 - C) Druhá analytická metoda – DNA identifikace
 - D) Struktura DNA a možné mutace, které se propisují do proteinů

(A) Úvod

- Proteiny vznikají v každé buňce na základě genetického kódu primární kod DNA, následuje přepis do RNA a translace do proteinu

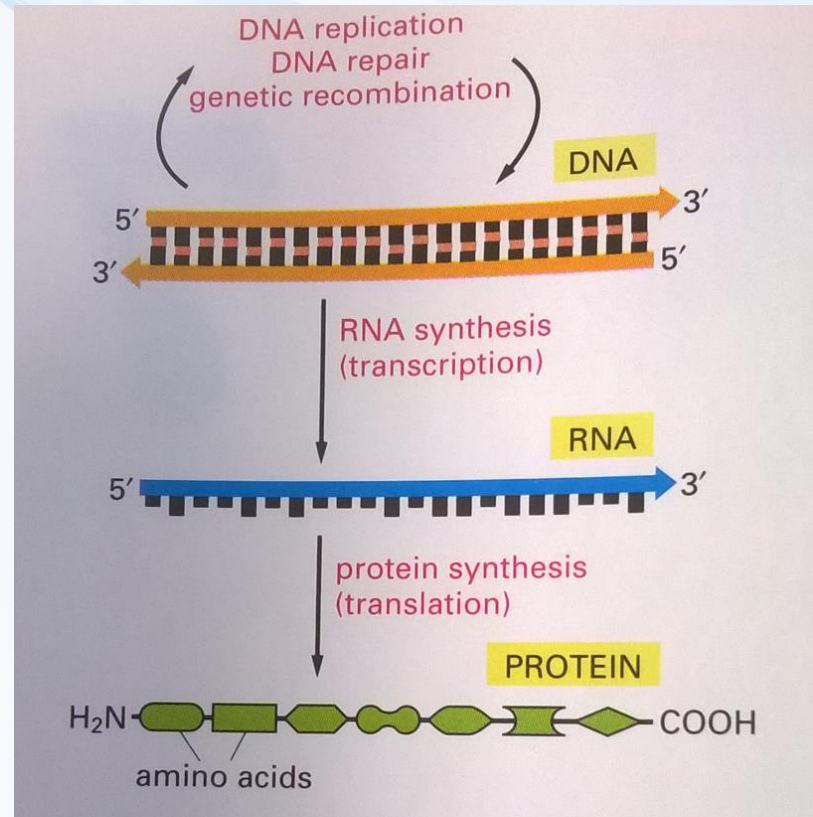


Figure 7-1 Genetic information directs the synthesis of protein. The flow of genetic information from DNA to RNA (transcription) and from RNA to protein (translation) occurs in all living cells.

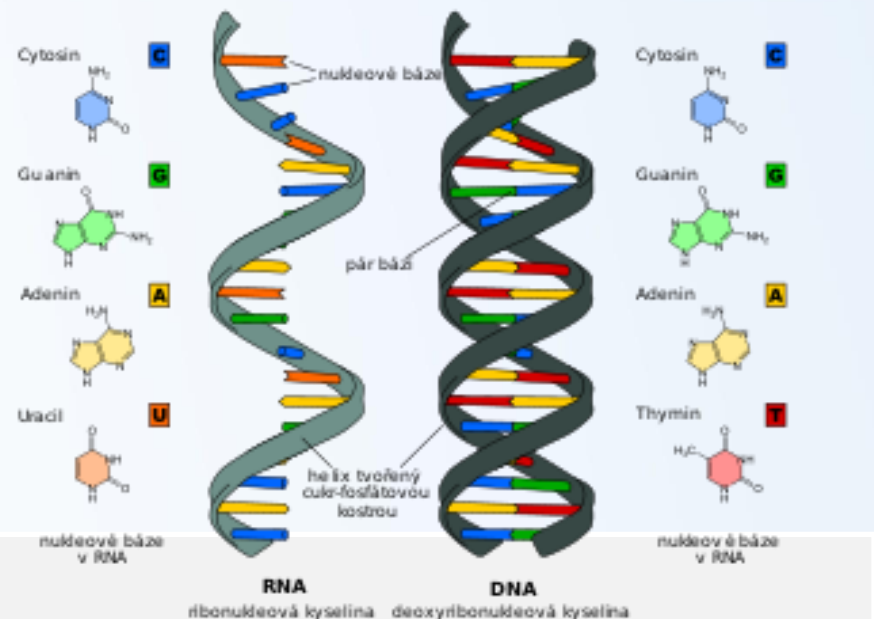
DNA (dlouhodobý kód proteinu) a RNA (krátkodobý kód)

Komponenty („kodovací písmena“) v DNA a RNA:

Adenine(A), Guanine(G), Cytosine(C), Uracil (U) and Thymine (T)

DNA: A, G, C, T

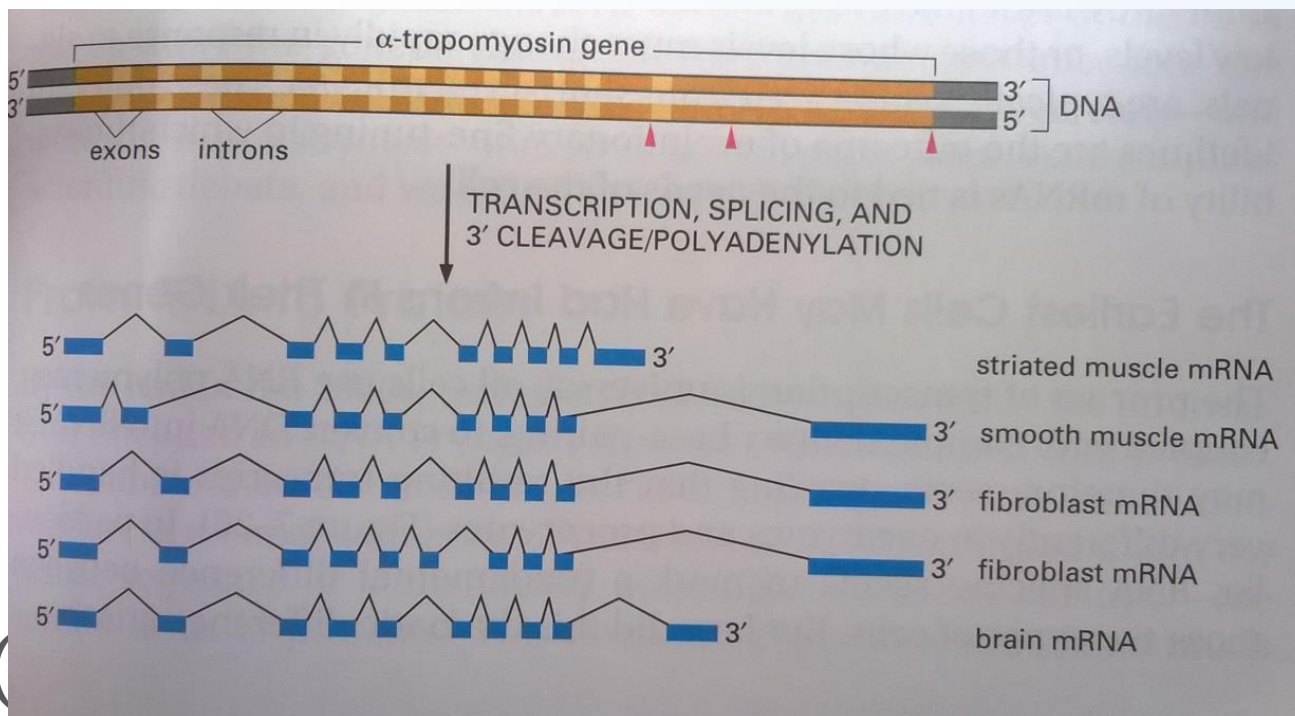
RNA: A, G, C, U



DNA a transkript RNA v různých buňkách

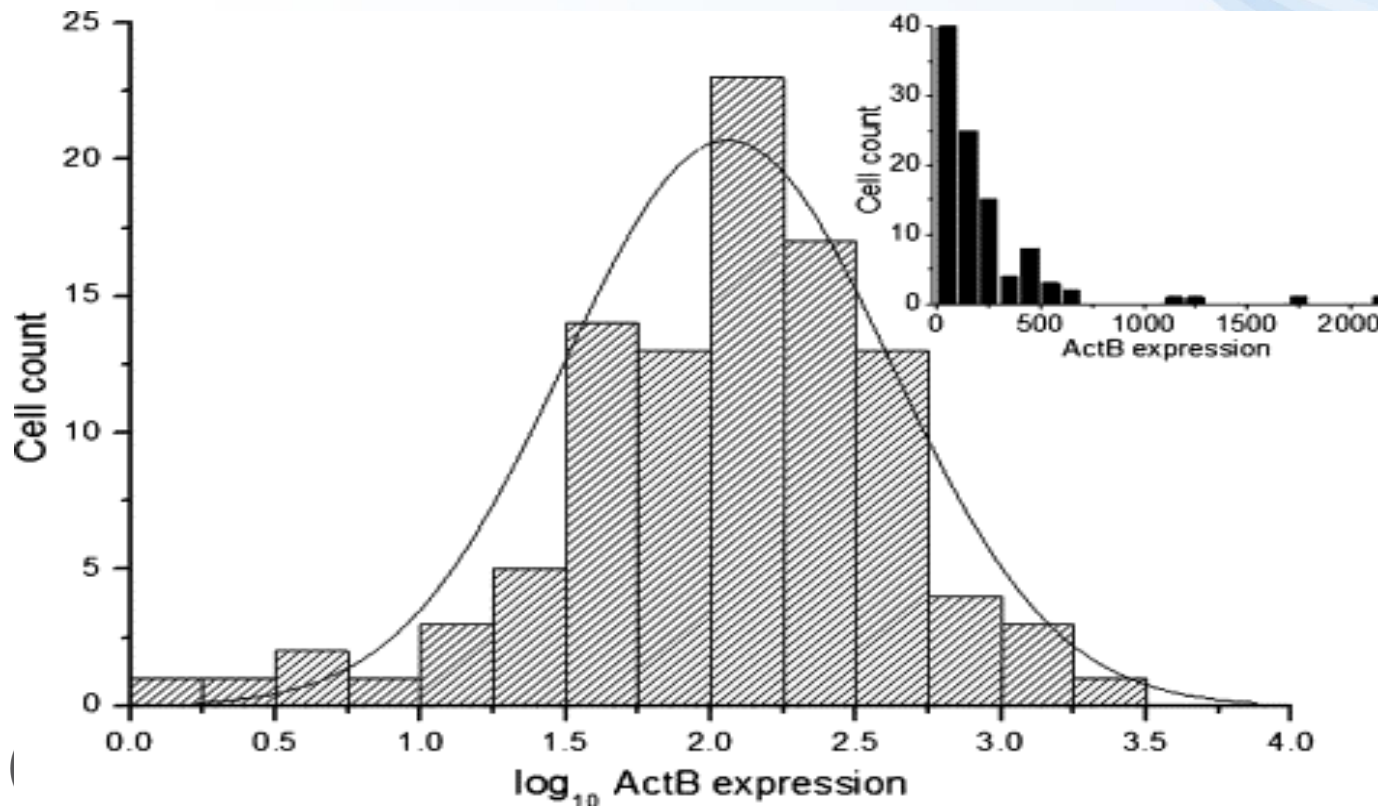
- !!! Každá buňka má identické DNA ve svém jádře, ale různé specifické buňky přepisují jen určitou část genetické informace:

Například: úsek s genetickým kódem pro tropomyosin -- velký rozdíl mezi neuronem v mozku a svalovou buňkou



RNA se ve stejném typu buněk nemusí generovat stejně:

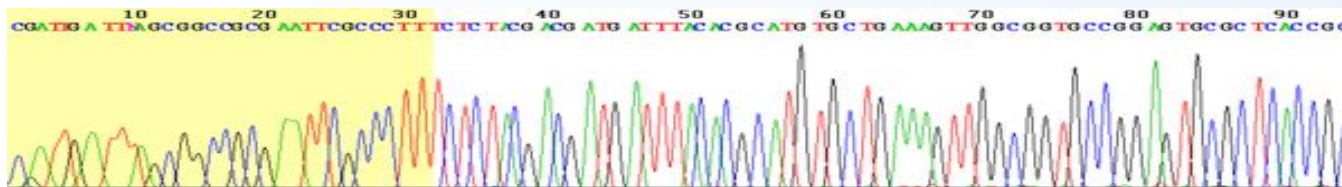
Produkce mRNA v sadě B-lymfocytů nacházejících se různě po těle



VYUŽITÍ RNA a DNA v klinické a technické (kriminální) praxi

Pozn: obecně na analýzu DNA i RNA existují dvě skupiny metod:

1) „ABSOLUTNÍ METODA“ - nazývaná odborně SEKVENOVÁNÍ DNA nebo RNA (docela drahé a pomalé) (v Brně díky jednomu panu profesorovi též povolen název sekvencování, ve zbytku ČR se moc ale neuvádí) je souhrnný termín pro metody, které umožňují popsat pořadí nukleotidů v určitém úseku DNA. Tedy i absolutní pořadí v celém genomu daného jedince (protože DNA je v principu jednorozměrný provázek genů a balastního kodu v řadě za sebou == 3.2 miliardy nukleotidů) V praxi jsou dnes používány především dvě metody založené na replikaci DNA – starší Sangerova sekvenace a novější, principem složitější sekvenování nové generace – Next Generation Sequencing.



Těmito sekvenačními metodami se v této přednášce nebudeme zabývat.

2) „METODA HLEDÁNÍ SPECIFICKÉHO OTISKU PRSTU v kupce sena“ - nedetekujeme absolutní sekvenci nějakého úseku DNA, nýbrž známe nějaký gen předem a využíváme tzv. PRIMER, tj. jeho „otisk jeho palce“ tedy zrcadlovou DNA, která „přesně komplementárně pasuje“ na specifickou sekvenci na začátku hledaného genu, respektive využívá i nějakou navazující laboratorní metodiku, která detekuje navázání PRIMERU a eventuelně kvantitativní určení kolik takových genetických kodů v buňce je (musíme samozřejmě vybrat takový PRIMER, která náhodou nemá i jiný gen)

---- na základní metody „hledání v kupce sena“ se podíváme blíže

PCR

(B) Analytická metoda 1 - tzv. PCR

...aneb jak zjistit zda danou sekvenci (například mutaci) pacient nebo podezřelý má ve svém DNA nebo nemá???

Example of Genetic code

(C = cytosine, G = guanine, A = adenine, T = thymine...) of 1% of 3rd human chromosome

```
AGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGC
CCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAA
GGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCT
CCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGC
TCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGG
CGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGA
GTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTG
GCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGC
GCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTG
TGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTA
TCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG
GTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC
ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATG
AGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGC
ATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATA
GCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCC
CCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAG
GAAAT
```



PCR

- Například potřebujeme ověřit zrovna tento úsek (např odpovědný za vadný protein inzulin)

Example of **one gene**

```
AGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGC
CCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAA
GGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCT
CCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGC
TCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGG
CGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGA
GTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTG
GCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGC
GCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTG
TGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTA
TCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG
GTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC
ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATG
AGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGC
ATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATA
GCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATGAGGTTGTGAGGCGCTGCC
```

- Přečíst u daného pacienta celý genom písmeno po písmenu a najít přesně tuto sekvenci by bylo časově nereálné a příliš drahé.

Proto se v klinice ujala PCR neboli

Polymerázová řetězová reakce

(anglicky *polymerase chain reaction*)

PCR

Co potřebujeme v laboratoři na PCR

1) Primer pairs (laicky řečeno „značku“ kterou má daný hledaný gen na svém předním a zadním „nárazníku“, podobně jako SPZ hledaného automobilu) : Primers are short oligonucleotides (synthetic short DNA strand), which complement the target sequence and bind to the single-stranded DNA. These primers are short compared to the template, only 20-40 **nucleotides** long (18 nucleotides minimum). Pairs of primers are employed in each reaction, but they should have **melting temperature (T_m)** values within 5°C of each other. Large variation in the T_m of a primer pair results in poor amplification. Primers should contain 50% GC (guanosine-cytosine content)-content (T_m 56-62°C), ideally. This content predicts their annealing temperature to the template; higher GC-levels correlate with a high T_m. A lower T_m will result in nonspecific products and a high T_m will result in decreased **amplicon** yield. In addition, perfect base pairing between the template and the **3' end** of the primer is critical. Each reaction should contain no more than 0.05-0.1 μM of each primer at final concentration.

2) dNTPs: DNA polymerase requires deoxynucleotide triphosphates – also known as dNTPs – the nucleic acid components, or nucleotide bases - adenine, thymine, cytosine and guanine (A, T, C, G) - to generate new DNA. In general, 20-200 μM (50 μM of each is ideal) of each dNTP should be included in the reaction. Excess dNTPs inhibits polymerase activity; whereas low dNTP concentration enhances the **fidelity** of polymerization but reduces the amplicon yield. Longer target sequences may require an increase in dNTP concentration. However, one must keep in mind that as dNTP concentration increases, so does the amount of (Mg²⁺) needed for optimal :amplification.

3) DNA polymerase DNA polymerase is a thermostable **enzyme** that synthesizes copies of DNA with every consecutive cycle of PCR. Polymerases are responsible for binding free nucleotides complementary to the template DNA. The enzyme first binds and adds a nucleotide to the 3'-OH group of the primer. The polymerase then moves in a 5'->3' direction, constantly adding **dNTPs**. It's necessary for the polymerase to come from alternate organisms from humans or other common vertebrates so the enzyme won't be broken down at the temperatures required to denature DNA during the PCR reaction. As such, bacteria from hot springs have provided some of these polymerases

Tyto tři komponenty přidáme k DNA pacienta (analyzovaná DNA), vše se vejde do malé ependorfkky a vložíme do zařízení, které precizně zahřívá a ochlazuje obsah ependorfkky ...začneme tzv „cyklovat“



- PCR

Úsek DNA = Gen který hledáme (zda je ve vzorku nebo není ve vzorku)

Před prvním cyklem:

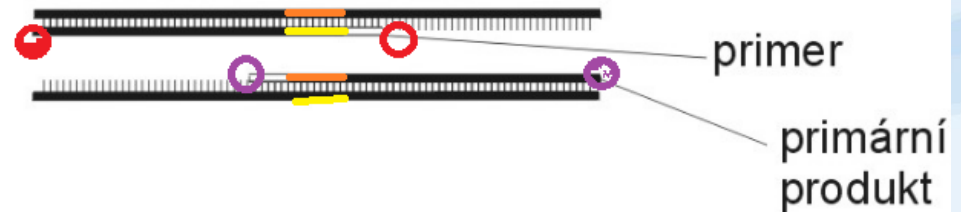


templát

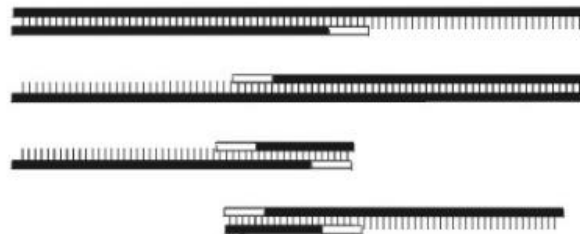


První cyklus levé a pravé vlákno se "zdvojí"

Po prvním cyklu:



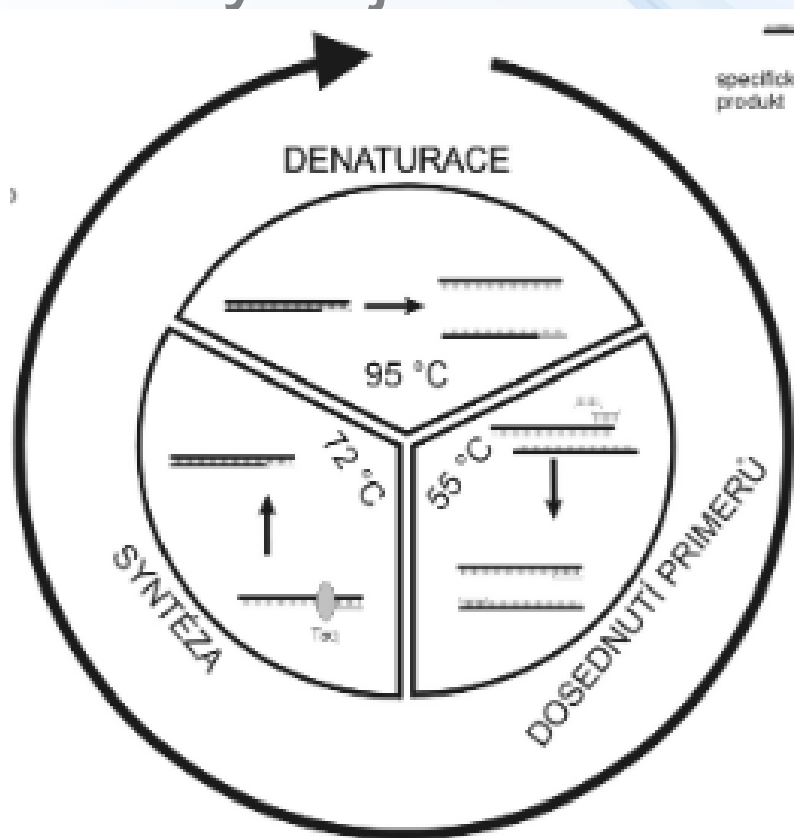
Po druhém cyklu:



specifický produkt

Tedy daný úsek, pokud je ve vzorku, se množí a množí ...

- Stále dokola cyklujeme:



Po sedmém cyklu:

2× ssDNA templátu

14× ssDNA primárního
produktu

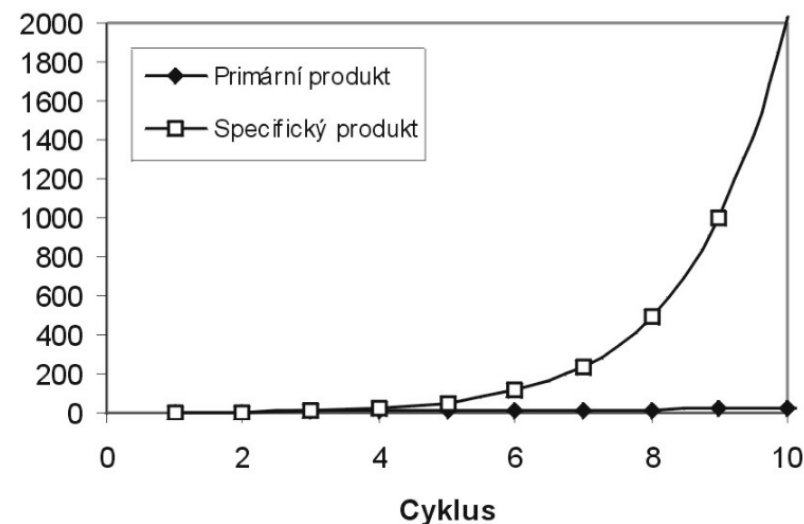
240× ssDNA specifického
produktu

Po osmém cyklu:

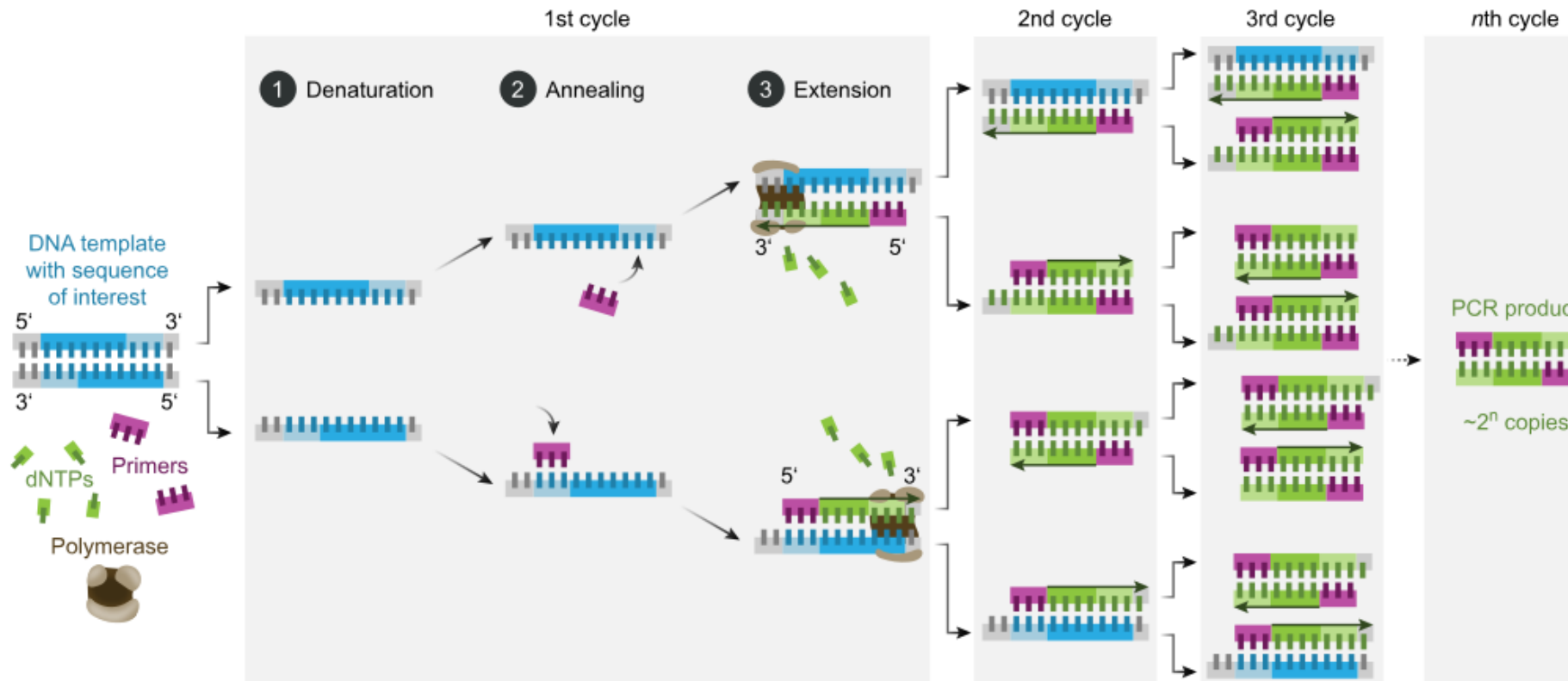
2× ssDNA templátu

16× ssDNA primárního
produktu

494× ssDNA specifického
produktu



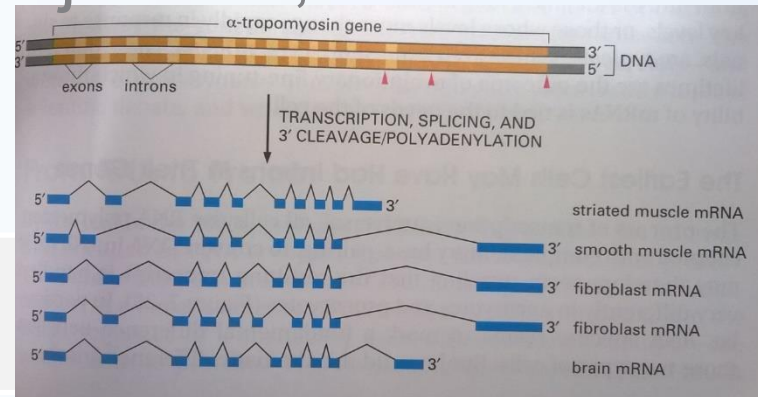
Celkové zjednodušené schema PCR v čase:



PCR

- Po deseti cyklech můžeme většinou „makroskopicky“ (elektroforéza, spektrofotometrie) stanovit zda se v ependorfce specifický produkt výrazně zmnožil nebo ne.
- Obdobně jako DNA můžeme analyzovat například i RNA specifickou sekvenci v lyzátu tkáně či nádoru. Ale zde je potřeba tzv. reverzní PCR (neboť RNA nemá v přírodní formě dvouřetězec)

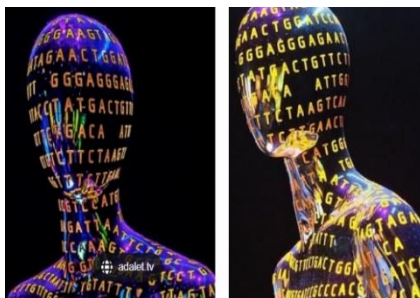
Touto metodou pak například lze zjistit zda v dané buňce se určitý úsek přepisuje málo, moc nebo vůbec (případně porovnávat jak je to před léčbou a po léčbě)



(C) Analytická metoda 2 - srovnání DNA vraha z místa činu a DNA podezřelého

...aneb jak zjistit ze zajištěné stopy na místě činu, že **DNA se shoduje** s nějakým konkrétním podezřelým sousedem ???

DNA dvou lidí se liší jen ve variabilních usecích, zbytek přes 99% mají všichni lidé stejný



Opět bychom tedy museli

sekvenovat a zapisovat celý genom u

obou získaných vzorků ??? Ne, není třeba...

Jde do chytře jinak:

*Policejní laboratorní přístroje (opět fungují na principu PCR) mají naprogramováno, že v celé dlouhé DNA, kterou dostanou ve zkumavce ze stěru vzorku, musí pomoci speciálních specifických „chemických nůžek“ (detaily například v /publikaci Slabý 2015 níže/) vystříhnout jen specifické geny – názvy těchto genů viz dále --- a velmi zjednodušený příklad jaký je technologický princip, aby tento gen v provazci byl poznán je na následujícím obrázku (tento gen je zde například ohraničen zleva i zprava velmi specifickou sekvencí **TTATT**)*

/5/ SLABÝ, Ondřej. Molekulární medicína. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.



DNA identifikace

V momentě, kdy analytický stroj **vysekne tento specifický gen** pro „vrahův vzorek“ (Obr.3-A) a kdy následně stroj vysekne tento gen pro „vzorek podezřelého souseda 1“ (Obr 3-B), tak stroj prokazatelně detekuje, že písmena v tomto genu (kombinace A,T,C,G) jsou jiná u vraha a jiná u souseda1

•

- Obr. 3-A (Gen z DNA zanechané vrahem na místě činu)

- **TTATT** **ACA** **ATA** **ACA** **ATA** **CCA** **TTATT**

- Obr. 3-B (Gen z DNA podezřelého SOUSED 1)

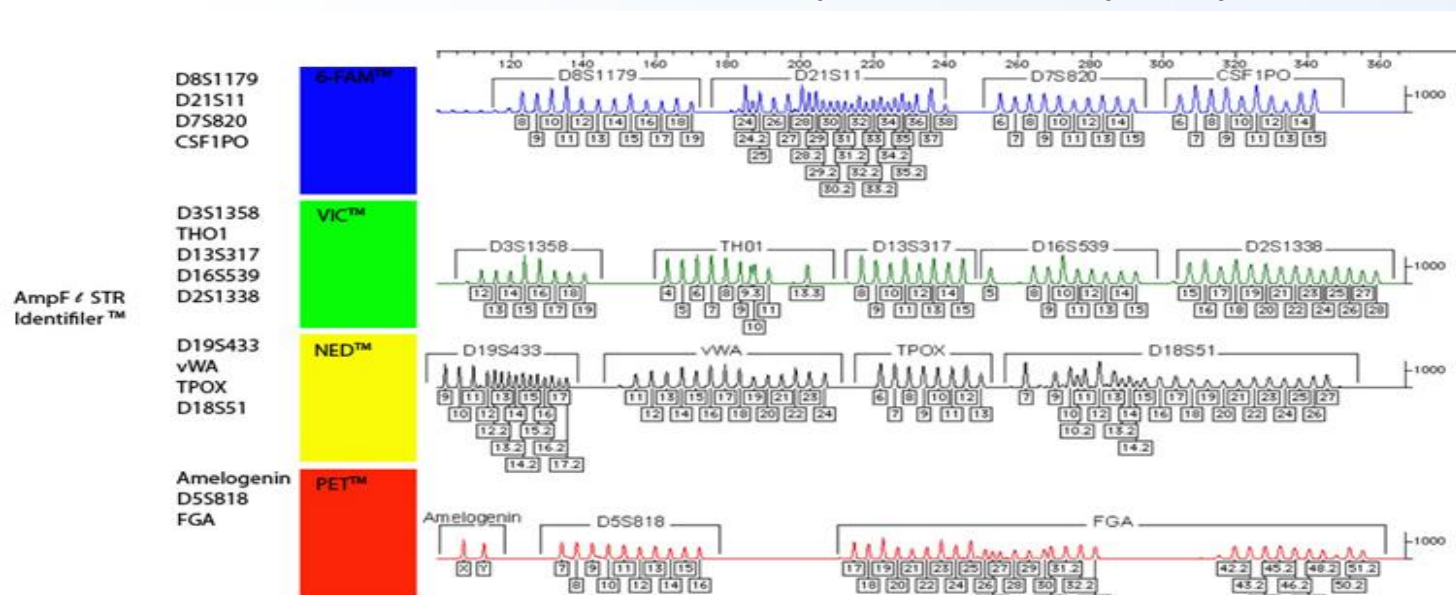
- **TTATT** **ATA** **ATA** **ACA** **ATA** **ATA** **ATA** **TTATT**

- Má nejen jiné složení kódu, ale i o tři báze delší celkovou délku (vrah = 15 bází, soused 1 = 18 bází)

DNA identifikace

Policejní metody byla unifikovány díky mezinárodním dohodám – tak aby každý stát neanalyzoval vlastní geny, ale aby byly vybrány srovnatelné úseky („čili stejné geny ve všech státech“) a pak lehce porovnatelné DNA profily mezi státy.

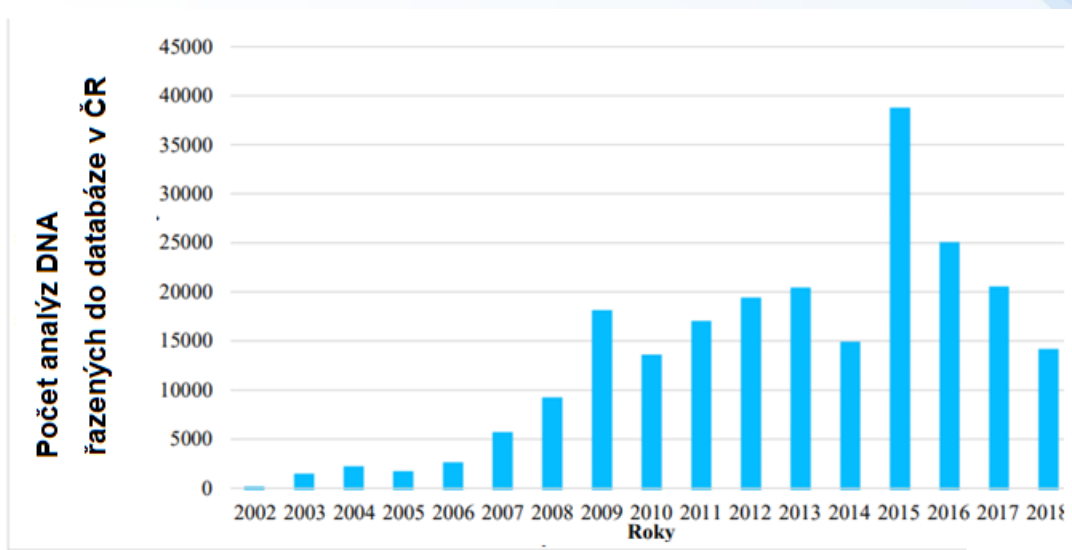
Používají se již dvacet let tzv. specifické úseky DNA se **SEKVENČNÍM NEBO DÉLKOVÝM POLYMOERFISMEM** --- zde například kit firmy Biosystems a názvy úseků:



DNA identifikace

Pro základní rychlou a levnou prvotní identifikaci a vyloučení podezřelých na začátku pátrání většinou policisté například použijí jen jeden úsek (např. CSF1PO), až když vyjde u některého podezřelého shoda s daným úsekem DNA z místa činu, provede se i další sada DNA úseků. Pokud se nakonec shoduje ve všech, jedná se pevný důkaz pro soud, že jde o daného pachatele (nebo eventuálně jeho jednovaječné dvojče – pak právníci umí zázraky a laboratorní dárky nestačí)

DNA analýzy se hojně používají teprve od 90. let v USA, v Evropě a jinde zhruba až od konce 20. století. Díky biologickým archivům vzorků, se však zpětně můžeme vrátit a analyzovat i stopy z vražd a krádeží i 40 let starých., jakmile se nově najde nějaké svědectví a podezřelá osoba. DNA ve zkumavce ve dvoušroubovici i při pokojové teplotě vydrží století, v mrazáku ještě déle.



Vidíme, že ještě v prvních letech tohoto století bylo využití DNA prakticky skoro nulové, několik desítek analýz ročně, zhruba od roku 2010 už ale očitě dosáhlo užití DNA analýz velkého rozmachu



(D) MUTACE a JEJICH DETEKCE

--mutace je změna genetického kódu v jádře, která se může projevit nejčastěji jako:

- a) Nemožnost smysluplně přepsat DNA do proteinu (protein pak chybí = narušení metabolismu nebo přímo smrt organismu)
- b) Možnost přepsat, ale sekvence aminokyselin v proteinu je nepřírozená (někdy protein i tak funguje, ale většinou je **abnormálně málo** nebo **abnormálně moc** aktivní oproti *tzv. wilde type*)

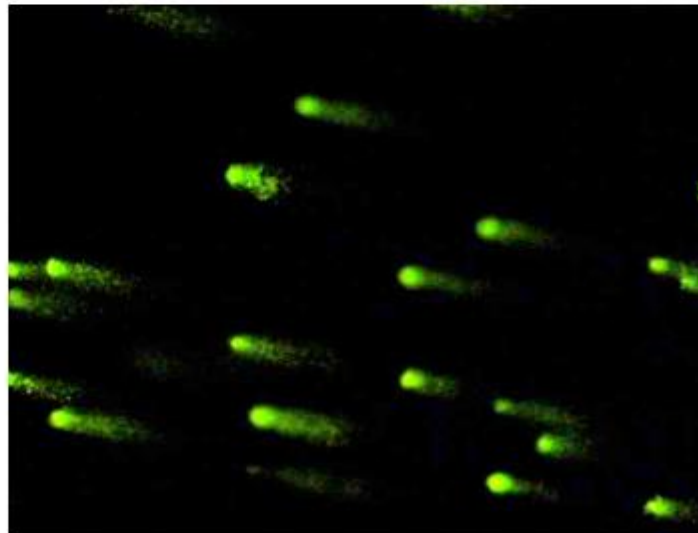
Mutate

Vybrané metody detekce mutací:

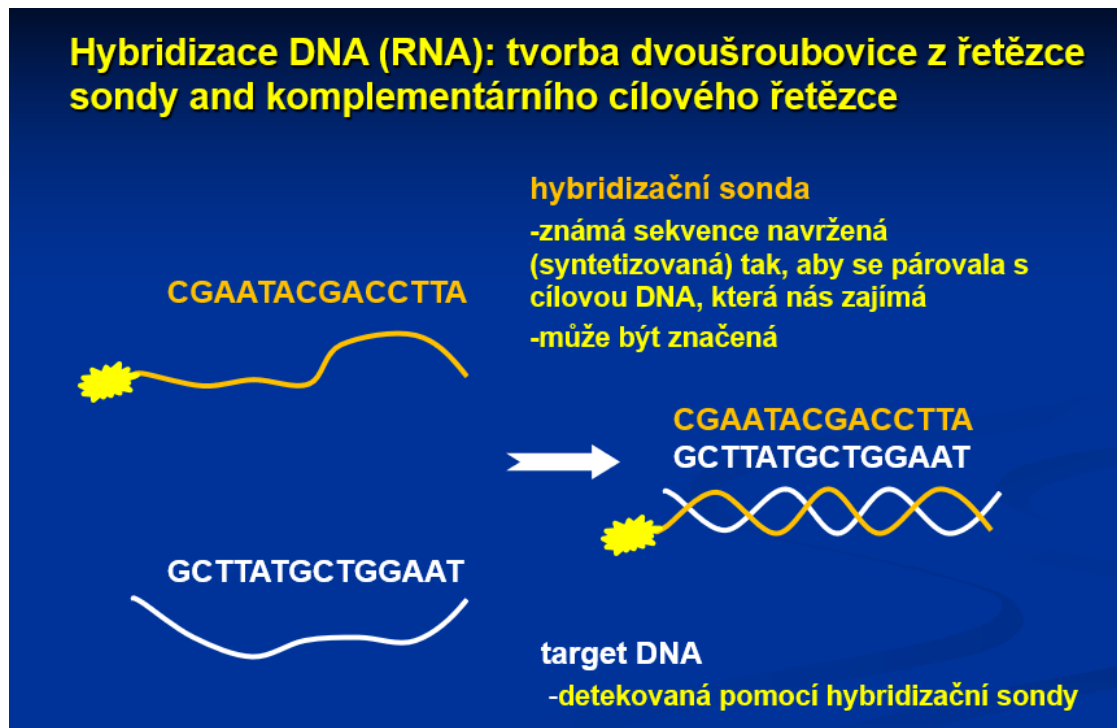
„comet assay“ (dsb)



„alkaline elution assay“ (ssb + alkali-labile sites)



- Vybrané metody detekce mutací:



Hodně používaný u barvení specifických mutací u typizace leukemií

Mutace

I bodová mutace (mutace jedné aminokyseliny) může výrazně ovlivnit aktivitu enzymu (důležité například pro metabolizování nějakého farmaka)

Například CYTOCHROM P450 2C9 (metabolizuje například warfarin):
u pacientu s mutací jediná záměna R144 za C144 (arginin zmutován na cystein) ovlivní geometrii vodíkových můstků a tedy rychlost vstupu warfarinu do centra enzymu (a tím pádem kinetiku přeměny a hladinu v organismu pacienta) (obrázek z vizualizačního in silico softwaru – 3D náhled na alfa helix D a vstup do akt. místa)

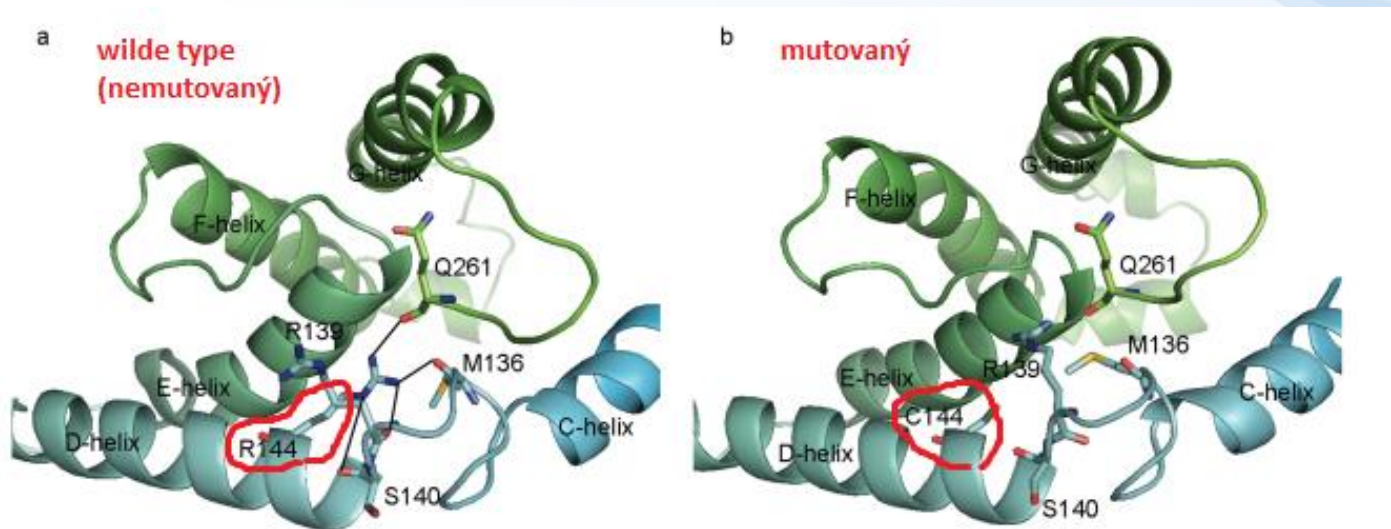


Figure 5. Network of hydrogen bonds formed by R144 in WT. (a) On the surface of the WT structure, helices C, D, and H are held by the network of hydrogen bonds indicated by black lines. The bonds are formed by guanidino group of R144 and carbonyl oxygen on the backbone of M136, R139, S140, and Q261. Such interactions are absent in R144C structure (b) due to a replacement of arginine to cysteine.
doi:10.1371/journal.pone.0074053.g005

Mutace

Mnoho mutací paradoxně nezdegradují sekundární a terciální strukturu enzymů, enzym si zachová relativně stejný tvar, avšak změna je například jen v zúžení nebo polaritě kanálu do aktivního místa ---často bylo pochopeno a až po namodelování tzv. IN SILICO pomocí simulačního softwaru.

Například in silico simulace v těchto farmakologických publikacích:

[HTML] [Comparison of the inhibitory effects of azole antifungals on cytochrome P450 3A4 genetic variants](#)

Y Yamaguchi, T Akiyoshi, G Kawamura... - Drug metabolism and ..., 2021

(PDF) [Computer-Aided \(In **Silico**\) Modeling of Cytochrome P450-Mediated Food–Drug Interactions \(FDI\)](#) [Y Guttman](#), [Z Kerem](#) - International Journal of Molecular Sciences, 2022 - mdpi.com

[PDF] [Computational analysis of missense variant CYP4F2* 3 \(V433M\) in association with human CYP4F2 dysfunction: A functional and structural impact](#) [MF Dehkordi](#), [L Mafakher](#), [F Samiee-Rad](#), [B Rahmani](#) - 2022

Mutate

Podrobné info o všech známých lidských proteinech a jejich mutacích lze najít na databázi NIH:

Stačí zadat klíčové slovo např: INSULIN nebo CYTOCHROM 2C9

The screenshot shows the NCBI Gene database page for CYP2C9. At the top, there is a search bar with "Gene" selected and a search button. Below the search bar, the gene name "CYP2C9 cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9 [Homo sapiens (human)]" is displayed. A "Download Datasets" button is visible on the right. The "Summary" section is expanded, showing the official symbol "CYP2C9" and the official full name "cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9". The page also includes a "Full Report" dropdown and a "Send to" dropdown.

The screenshot shows the NCBI Variation Viewer for CYP2C9. It displays a list of ClinVar variants with precise endpoints, including their positions and alleles. A pop-up window highlights a specific variant: "94949282..94949282" with ClinVar Variation ID "285601" and SNP ID "rs9332131". The interpretation is "Benign/Likely benign; drug response; other" and the molecular consequence is "frameshift variant". The location is "94,949,282". Below the variants, there are tracks for RNA-seq exon coverage, RNA-seq intron-spanning reads, and RNA-seq intron features.

The screenshot shows the NCBI RefSeq browser for CYP2C9. It displays the genomic sequence on chromosome 10 (NC_000010.11) and the gene structure with exons and introns. The RefSeq annotation shows the gene structure and the location of the variant. The browser also includes tracks for biological regions, such as promoters and enhancers, and a list of associated biological processes and pathways.

Mutace

- Řada mutovaných enzymů má i své mezinárodní medicinské označení, např varianty P450 2C9:

P450 2C9 Variants	rsID	DNA mutace	...způsobí změnu	Reported Alleles	Frequency
		Nucleotides Changes	Amino Acids Changes		
M01	10:96701652	T206C	F69S	-	0.231%
M02	rs72558187	T269C	L90P	*13	0.693%
M03	rs12414460	G371A	R124Q	*42	0.231%
M04	rs72558189	G374A	R125H	*14	0.231%
M05	rs7900194	G449T	R150L	*27	1.155%
M06	rs182132442	C835A	P279T	*29	0.693%
M07	10:96731969	C928G	L310V	-	0.231%
M08	rs1057910	A1075C	I359L	*3	6.928%
M09	rs56165452	T1076C	I359T	*4	0.231%
M10	10:96748741	G1429A	A477T	*30	0.426%
M11	10:96740948	C970T	Q324X	-	0.462%

Genetic variations of P450 2C9 in Korean populations a

Zdrojový článek: Functional Characterization of Pharmacogenetic Variants of Human Cytochrome P450 2C9 in Korean Populations
Article --Sep 2019 -- Myung-A Cho

Mutace

Vnější faktory mohou způsobit v DNA jen klasickou mutaci (záměnu nukleotidů, delecii či přehození sekvence), při malém množství má buňka často opravné mechanismy. Ale velký stresor může také způsobit „slepení“ DNA (nemožnost přepisu),

degradaci celého velké části chromozomu

nebo enzymů a pomocných proteinů

potřebných pro přepis

(pak často buňka vyhodnotí

situaci a nastartuje buněčnou

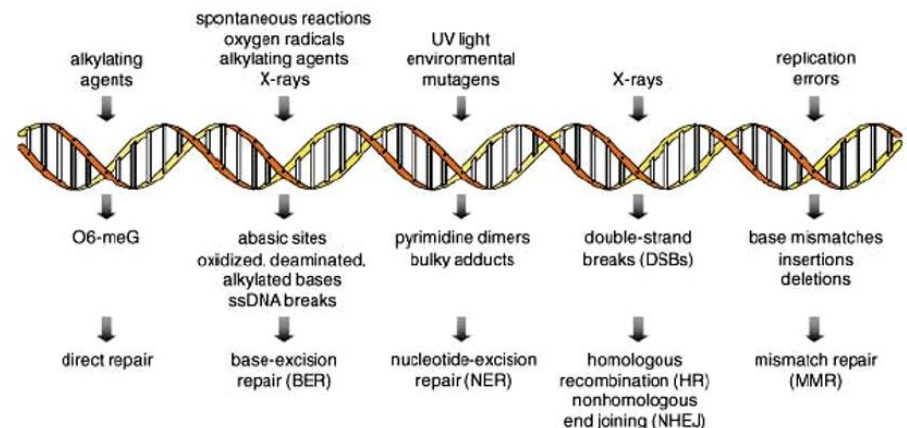
smrt, např po smrtelné

dávce UV nebo gama záření)

DNA in the cells is permanently exposed to various chemical or physical agents

➤ endogenous - products and intermediates of metabolism

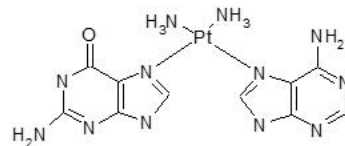
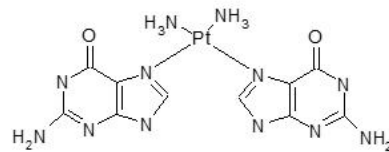
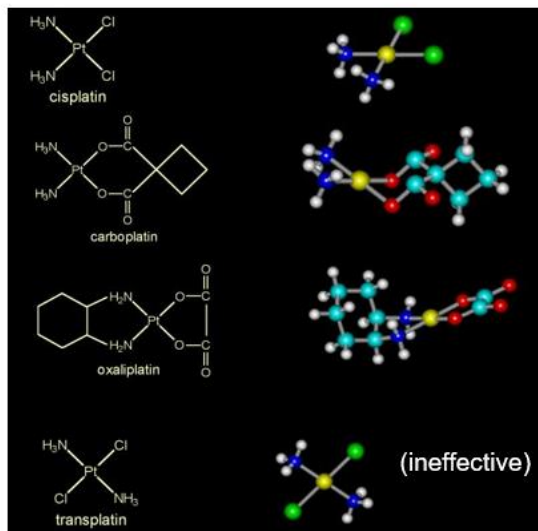
➤ exogenous - environmental (radiation, pollutants)



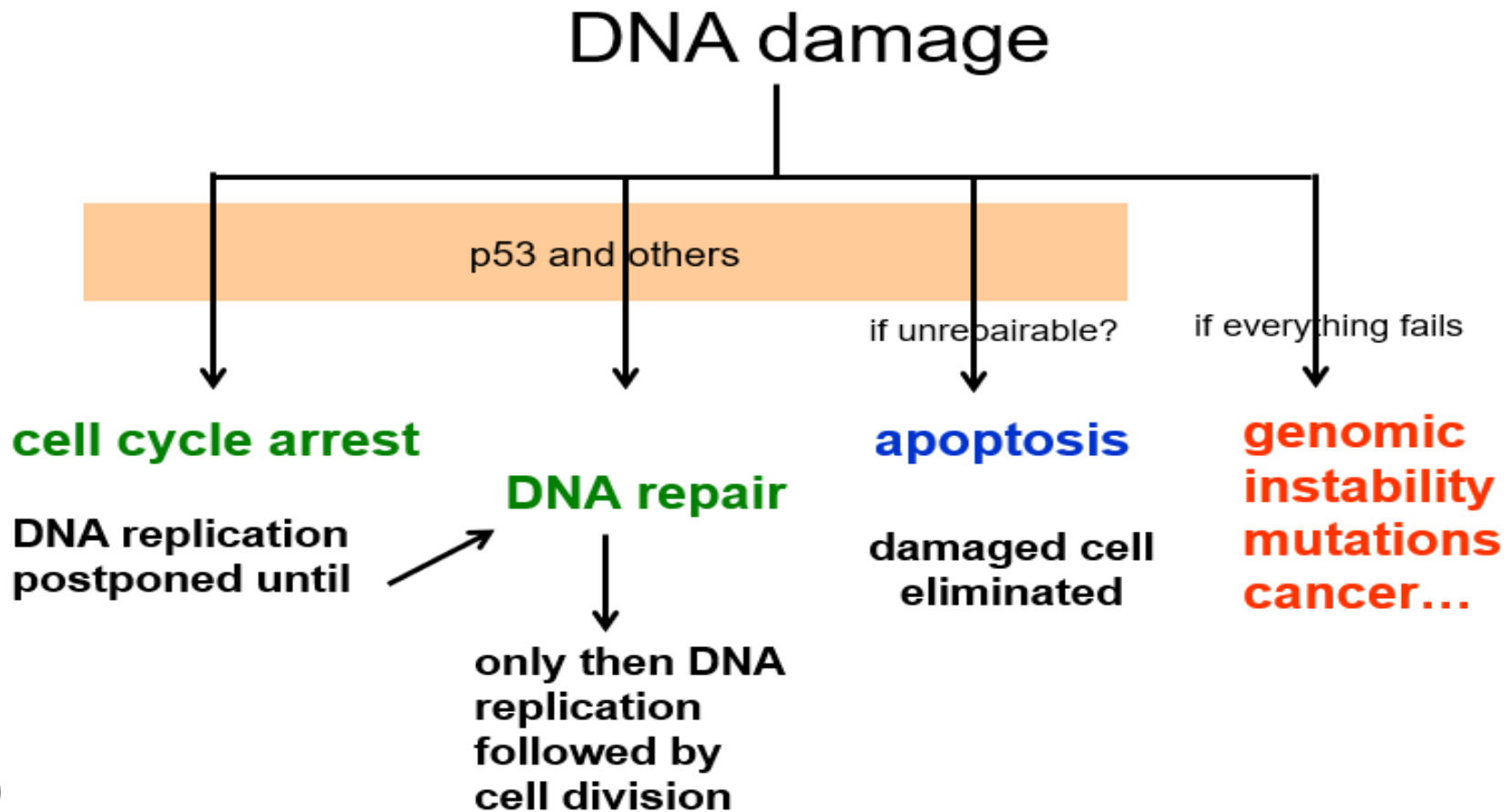
- I některé protinádorové léky defacto cíleně působí degradaci nebo konzervaci DNA a brání tak přepisu resp. replikaci DNA a dělení nádorové buňky

anticancer drugs

- some types of antineoplastic agents act via formation of DNA adducts
- metallodrugs: mainly platinum complexes



Závěr k mutacím: Obecné působení stresorů na DNA



Domácí úkol - za body

• Domácí úkol:

Každý student nalezne v tabulce své učo. Ke každému uču je zadán **jeden protein** (nějaký cytochrom P450) a **pozice aminokyseliny**.

Úkolem je nalézt pomocí PDB.org a napsat co je na této pozici za aminokyselinu, nalézt v 3D náhledu zda je aminokyselina součástí alfa-helixu a zapsat genetický kód této aminokyseliny (primární kod DNA).

Tři tyto jednoduché odpovědi dá každý sám za sebe do txt souboru nebo wordu a vloží do odevzdávacího v IS.MUNI do 15. května 2023.

(za správné řešení extra 3 bonus body na zkuškový test)

	STUDENT	aminokyselina	Protein
1.	509491	235	P450 3A4
2.	509493	233	P450 2D6
3.	505990	36	P450 2C9
4.	495244	14	P450 3A4
5.	507466	211	P450 2D6
6.	509438	288	P450 2C9
7.	509470	256	P450 3A4
8.	509406	320	P450 2D6
9.	509474	252	P450 2C9
10.	509407	319	P450 3A4
11.	505392	122	P450 2D6
12.	509502	224	P450 2C9
13.	509446	280	P450 3A4
14.	509447	279	P450 2D6
15.	509397	329	P450 2C9
16.	509479	247	P450 3A4
17.	509482	244	P450 2D6
18.	509452	274	P450 2C9
19.	509483	243	P450 3A4
20.	509453	273	P450 3A4
21.	509454	272	P450 3A4
22.	509411	315	P450 2D6
23.	464772	54	P450 2C9
24.	509456	270	P450 3A4
25.	516530	44	P450 2D6
26.	505802	99	P450 2C9
27.	505688	33	P450 3A4
28.	509505	221	P450 2D6

29.	505820	122	P450 2C9
30.	509486	240	P450 3A4
31.	507337		P450 2D6
32.	506830	196	P450 2C9
33.	509416	310	P450 3A4
34.	509464	262	P450 2D6
35.	516529	338	P450 2C9
36.	509490	236	P450 3A4

