

Prevalencia de mutaciones *CYP2D6* en enfermedad de Parkinson esporádica: estudio caso-control

Prevalence of CYP2D6 mutations in sporadic Parkinson's disease: case-control study

D. Guerrero¹, M. García-Delgado², R. Larumbe¹, J.L. Vizmanos², F.J. Novo², J.J. Viñes³

RESUMEN

Los factores genéticos parecen tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. La degeneración de la sustancia negra, característica de esta enfermedad, puede deberse al efecto tóxico de sustancias derivadas del metabolismo celular. El gen *CYP2D6* codifica para la enzima metabolizadora debrisoquina-4-hidroxilasa implicada en la detoxificación de parte de estos productos. La presencia de determinadas mutaciones en el gen conlleva la falta de actividad enzimática y genera el fenotipo "pobre metabolizador". Se ha analizado mediante la técnica de PCR-RFLP la presencia de las mutaciones genéticas *CYP2D6* 3, *CYP2D6* 4, *CYP2D6* 6 y *CYP2D6* 8 en un grupo de 46 pacientes con EP y en 54 controles, con el fin de estudiar el posible valor del genotipo *CYP2D6* como factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson en la población navarra. Los alelos *CYP2D6* 3, 6 y 8 no están representados en la población de estudio. No hemos obtenido una mayor prevalencia de mutaciones *CYP2D6* 4 en los pacientes con respecto a los controles (30,43% vs 44,44%). No existe correlación entre la enfermedad de Parkinson y la presencia de las mutaciones *CYP2D6* 4 (odds ratio 0,55; 95% IC 0,24 a 1,25), en homocigosis (odds ratio 0,38; 95% IC 0,04 a 3,76) o en heterocigosis (odds ratio 0,62; 95% IC 0,27 a 1,44). En conclusión, el genotipo *CYP2D6* no constituye un factor de riesgo en EP.

Palabras clave. Estudio caso-control. Enfermedad de Parkinson. RFLP. Citocromo P450. Polimorfismo *CYP2D6*.

ABSTRACT

Genetic factors seem to play an important role in the development of Parkinson's disease. The degeneration of the *substantia nigra*, characteristic of this disease, might be due to the toxic effect of substances derived from cellular metabolism. The *CYP2D6* gene codifies for the metabolising enzyme debrisoquine-4-hydroxylase involved in the detoxification of part of these products. The presence of certain mutations in the gene implies a lack of enzymatic activity and generates the "poor metaboliser" phenotype. By means of the PCR-RFLP technique, the presence of the genetic mutations *CYP2D6* 3, *CYP2D6* 4, *CYP2D6* 6 and *CYP2D6* 8 has been analysed in a group of 46 patients with PD and in 54 controls, with the aim of studying the possible value of genotype *CYP2D6* as a risk factor for Parkinson's disease in the population of Navarra. The alleles *CYP2D6* 3, 6 and 8 are not represented in the sample studied. We have not obtained a greater presence of *CYP2D6* 4 mutations in the patients with respect to the controls (30.43% vs. 44.44%). There is no correlation between Parkinson's disease and the presence of *CYP2D6* 4 mutations (odds ratio 0.55; 95% CI 0.24 to 1.25), in homozygosis (odds ratio 0.38; 95% CI 0.04 to 3.76) or in heterozygosis (odds ratio 0.62; 95% CI 0.27 to 1.44). In conclusion, the genotype *CYP2D6* does not constitute a risk factor in PD.

Key words. Case-control study. Parkinson's Disease. RFLP. Cytochrome P450. Polymorphism *CYP2D6*.

ANALEs Sis San Navarra 2002; 25 (2): 147-154.

1. Centro de Investigación Biomédica. Servicio Navarro de Salud.
2. Departamento de Genética. Universidad de Navarra.
3. Servicio de Docencia, Investigación y Desarrollo Sanitarios. Departamento de Salud. Gobierno de Navarra.

Aceptado para su publicación el 24 de enero de 2002.

Correspondencia

Dra. Rosa Larumbe
Centro de Investigación Biomédica
C/ Irunlarrea, 3
31008 Pamplona
Tfno. 948 422186
Fax 948 422200

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la etiología de la enfermedad de Parkinson (EP) no ha sido completamente aclarada. Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia negra del cerebro mediante mecanismos que precisan de un estudio detallado^{1,2}. Diversos factores ambientales y genéticos parecen contribuir a la patogénesis de la EP³. La implicación de factores genéticos en la EP se refleja en las alteraciones presentes en genes como el de la α -sinucleína (α -SYN) o el gen *parkin*, entre otros. De esta forma, se ha descrito la presencia de mutaciones puntuales en la región codificante del gen de la α -sinucleína de forma exclusiva únicamente en algunas pocas familias con EP autosómica dominante de la región mediterránea central⁴, mientras que las alteraciones del gen *parkin*, debidas a mutaciones, deleciones y duplicaciones génicas, son más frecuentes y han sido descritas en pacientes con EP juvenil autosómica recesiva y en algunos casos con EP esporádica⁵. Aunque el papel de la herencia en la EP esporádica no ha sido confirmado⁶, hay estudios que sugieren la existencia de genotipos de susceptibilidad, como la combinación del polimorfismo 1 en la región promotora del gen de la α -sinucleína y la variante alélica (*APOE*) ϵ -4 del gen de la Apolipoproteína E⁷. Sin embargo, un estudio reciente basado en un grupo más numeroso de pacientes y controles no ha demostrado la correlación entre el genotipo mencionado y la EP esporádica⁸. No existe consenso en la teoría de la predisposición genética a EP debida al efecto fenotípico de las variantes alélicas de diversos genes que codifican para enzimas detoxificadoras^{9,10}. Las glutatión transferasas¹¹ y la debrisoquina-4-hidroxilasa¹² son ejemplos de enzimas que metabolizan sustancias xenobióticas u otros metabolitos dañinos para las células. En este sentido, la presencia de neurotoxinas ambientales tales como 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolinas (TIQ) ó 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP)¹³ y pesticidas¹¹ parecen contribuir a la muerte selectiva de células dopaminérgicas y favorecer los síntomas del parkinsonismo debidos a la disfunción de las enzimas mitocondriales¹⁴ (complejo α -cetoglutarato-deshidrogenasa, NADH-CoQ reductasa) y estrés oxidativo¹⁵.

La debrisoquina-4-hidroxilasa se expresa en neuronas y pertenece a la superfamilia de las monoaminooxidasas del citocromo P450¹⁶. Está implicada en el metabolismo de la debrisoquina, esparteína, MPTP y más de 25 fármacos usados con fines terapéuticos¹⁷. El fenotipo denominado "pobre metabolizador" del metabolismo debrisoquina/esparteína es consecuencia de la falta de actividad del enzima¹⁸, y aparece con frecuencias del 5 al 10% en individuos de raza caucásica¹⁹ y menor del 1% en individuos de raza asiática²⁰.

El gen que controla la proteína debrisoquina-4-hidroxilasa, denominado *CYP2D6*, está situado en la región 22q13.1²¹ y se ha propuesto como posible locus de susceptibilidad a EP²² en relación a la presencia de determinadas mutaciones en la región codificante del gen que suponen la inactividad de la enzima. De esta forma, varios estudios demuestran la correlación entre diversas formas mutantes del gen *CYP2D6* con la EP^{22,23}, aunque otros grupos descartan tal correlación^{16,18}.

Caracterizamos los genotipos *CYP2D6* 3 (*CYP2D6* A), *CYP2D6* 4 (*CYP2D6* B), *CYP2D6* 6 (*CYP2D6* T) y *CYP2D6* 8 (*CYP2D6* G) en una muestra de 46 pacientes con EP idiopática y 54 controles, todos ellos incluidos en un estudio caso-control realizado en una región del norte de España –Navarra–, con el fin de estudiar el posible valor de este gen como factor de riesgo en EP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y controles

En nuestro estudio incluimos 46 pacientes diagnosticados de EP idiopática durante el período 1993-1995. Los pacientes fueron identificados por neurólogos en servicios de Neurología en Navarra, y después fueron reconocidos por un neurólogo experto en enfermedades neurológicas, quien verificó el diagnóstico de EP de acuerdo a los criterios de Hughes y col²⁴. El grupo de pacientes incluía 31 hombres y 15 mujeres de edades comprendidas entre 51 y 87 años (edad media 69,8 \pm 7,8).

El grupo control se obtuvo del registro de los hospitales de la misma región a los que pertenecían los enfermos durante el mismo período de tiempo. El origen de los pacientes y controles fue idéntico, obviando el posible sesgo en nuestro estudio debido a este factor. El grupo de pacientes incluía 54 individuos pareados con los controles por los criterios de edad, sexo y lugar de residencia, 39 hombres y 15 mujeres con edad media de $69,09 \pm 7,06$ años. La tabla 1 muestra las características demográficas y clínicas de los pacientes y controles.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y controles.

Toma de muestra de sangre y extracción de DNA

El DNA de alto peso molecular fue aislado de los leucocitos por medio de digestión con proteinasa K, protocolo de extracción con fenol-cloroformo estándar y precipitación con etanol. La concentración de DNA fue medida y estandarizada a un valor aproximado de 20 ng/ml mediante espectrofotometría.

Análisis PCR-RFLP

La estrategia usada para la identificación de las formas alélicas *CYP2D6* 3 (*CYP2D6 A*)²², 4 (*CYP2D6 B*)²⁵, 6 (*CYP2D6 T*)²⁶, 8 (*CYP2D6 G*)²⁷ consiste en PCRs anidadas, y análisis de los fragmentos de restricción de longitud variable tras digestión

enzimática (técnica RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

El primer paso fue la amplificación de los nueve exones del gen *CYP2D6*, correspondiente a un fragmento de 4.681 pares de bases (pb), mediante el kit *Expand Long Template PCR*TM (Boehringer Mannheim, UK) en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480. Este método genera un alto rendimiento de producto por medio de la mezcla de *Taq* y *Pwo* DNA Polimerasas. El producto mencionado se emplea para realizar posteriores PCRs anidadas, siguiendo las condiciones de estudios previos^{25,27,28}. Éstas consistieron en la amplificación de un fragmento de 353 pb y un fragmento de 201 desde el producto de 4.681 pares de bases. El primer fragmento incluye los exones 3 y 4 del gen *CYP2D6* para el análisis de los genotipos *CYP2D6* 4, 6 y 8, y el segundo comprende el exón 5 del gen que incluye el posible genotipo *CYP2D6* 3. El cambio genético asociado a cada forma alélica queda reflejado en la tabla 2.

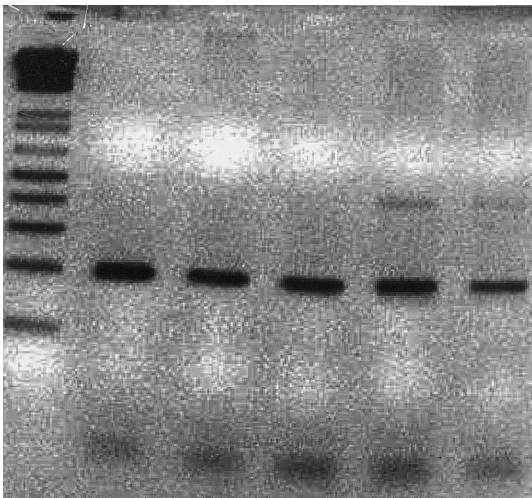
Los alelos fueron identificados mediante digestión con diferentes enzimas de restricción de los productos obtenidos y posterior visualización de los patrones de bandas marcadas con bromuro de etidio en gel de agarosa al 3% (Fig. 1). El alelo mutante *CYP2D6* 3 puede ser identificado mediante la digestión con la endonucleasa *BsaAI* del producto anidado de 201 pb, que queda cortado en fragmentos de restricción de 180 y 21 bases en la posición 2637 para el alelo mutante (Fig. 1.a). La secuencia del alelo mutante en la posición 1934 (*CYP2D6* 4) carece de un sitio de restric-

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de casos y controles.

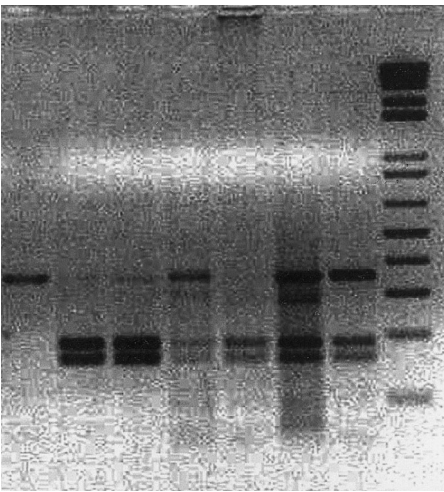
Características	Casos n = 46	Controles n = 54
Sexo		
. Hombre	31	39
. Mujer	15	15
Edad (años)		
. Media (SD)	69,8 ($\pm 7,8$)	69,09 ($\pm 7,06$)
. Rango de edad	53-87	51-87
Duración de síntomas		
. Años	3,3	

Tabla 2. Nomenclatura de los genotipos CYP2D6 analizados junto con los cambios genéticos asociados.

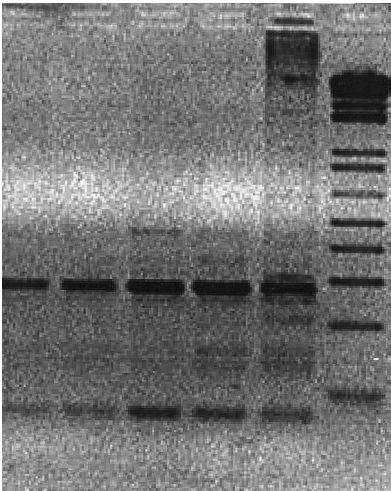
GENOTIPOS <i>CYP2D6</i>	CAMBIO GENÉTICOASOCIADO	
<i>CYP2D6 A (CYP2D6 3)</i>	Deleción de adenina en posición 2637	(Del A ₂₆₃₇)
<i>CYP2D6 B (CYP2D6 4)</i>	Transición guanina a adenina en posición 1934	(G ₁₉₃₄ A)
<i>CYP2D6 T (CYP2D6 6)</i>	Deleción de timina en posición 1795	(Del T ₁₇₉₅)
<i>CYP2D6 G (CYP2D6 8)</i>	Transición guanina a adenina o transversión guanina a timina en posición 1846	(G ₁₈₄₆ T /A)



1.a



1.b



1.c

Figura 1. Ejemplos de polimorfismos *CYP2D6 3, 4 y 8* resultado de la digestión con *Bsa AI* (1.a), digestión con *Bst VI* (1.b), digestión con *Msp I* (1.c), respectivamente.

Figura 1.a: **M** +/+ +/+ +/+ +/+ +/+

Figura 1.b: -/- +/+ +/+ -/+ +/+ -/+ -/+ **M**

Figura 1.c: +/+ +/+ +/+ +/+ +/+ **M**

(+/+ = ausencia de mutación; +/- = presencia de mutación en heterocigosis; -/- = Presencia de mutación en homocigosis; **M** = Marcador).

Tabla 3. Distribución de genotipos CYP2D6 en pacientes con EP y controles.

Genotipos CYP2D6		Casos n = 46	Controles n = 54
CYP2D6 3	sn / sn	46	54
	sn / mut	0	0
	mut / mut	0	0
CYP2D6 4	sn / sn	32	30
	sn / mut	13	21
	mut / mut	1	3
CYP2D6 6	sn / sn	46	54
	sn / mut	0	0
	mut / mut	0	0
CYP2D6 8	sn / sn	46	54
	sn / mut	0	0
	mut / mut	0	0

sn = alelo secuencia nativa; mut = mutación.

Tabla 4. Distribución de genotipos y valores de odds ratio en el análisis de polimorfismos CYP2D6 4 en pacientes y controles.

Secuencia CYP2D6	Casos (%)	Controles (%)	Odds ratio (95% IC)
Mutación	14 (30,43%)	24 (44,44%)	0,55 (0,24-1,25)
- Homocigosis (%)	1 (2,17%)	3 (5,55%)	0,38 (0,04-3,76)
- Heterocigosis (%)	13 (28,26%)	21 (38,88%)	0,62 (0,27-1,44)
Secuencia normal (%)	32 (69,56%)	30 (55,55%)	1,83 (0,80-4,18)

ción para *BstNI*, enzima que en la secuencia salvaje corta el producto anidado de 353 pb y da lugar a fragmentos de 190 y 163 pb (Fig. 1.b). Una delección en la posición 1795 (*CYP2D6 6*) crea un nuevo sitio para la enzima *BstNI* que genera tres fragmentos de 190, 139 y 23 pb desde el fragmento de 353 pb. La ausencia de un sitio de restricción en la posición 1846 de este gen para la enzima *Msp I* caracteriza la mutación *CYP2D6 8*. En la secuencia salvaje la digestión del mismo fragmento de 353 pb genera dos fragmentos de 278 y 75 pb (Fig. 1.c).

Se empleó el análisis univariante de regresión logística para calcular el valor de odds ratio y analizar la posible asociación entre los polimorfismos en pacientes y controles (Intervalo de confianza 95%, $P < 0,05$).

RESULTADOS

Este estudio ha caracterizado cuatro formas alélicas diferentes por análisis del mapa de restricción en un grupo formado

por 46 pacientes y 54 controles, tal y como se refleja en las tablas 3 y 4. Los alelos mutantes *CYP2D6 3*, *6* y *8* no están representados en los grupos de pacientes y controles. *CYP2D6 4* está presente en el grupo de controles y pacientes (30,43% en el grupo de pacientes *versus* 44,44% en el grupo control; odds ratio 0,55, 95% IC 0,24 a 1,25). Nuestro estudio ha revelado una baja frecuencia de genotipos homocigóticos mutantes *CYP2D6 4* (2,17% pacientes *versus* 5,55% controles). Individuos con el genotipo mut/mut no presentan un riesgo significativamente mayor de sufrir EP (odds ratio 0,38, 95% IC 0,04 a 3,76). Por otro lado, hemos hallado 13 pacientes heterocigotos para la presencia de genotipo *CYP2D6 4* (genotipos N/B) en contraposición a 21 pacientes en el grupo de controles (28,26% *versus* 38,88%, respectivamente). La presencia de genotipos mutantes heterocigóticos *CYP2D6 4* no se asocia con un aumento significativo en el riesgo de padecer EP (odds ratio 0,62, 95% IC 0,27 a 1,44).

DISCUSIÓN

En concordancia con estudios previos, no hemos hallado ninguna evidencia de que la presencia de mutaciones en el gen *CYP2D6* se relaciona con una mayor susceptibilidad a padecer EP esporádica en una población española.

Diversos grupos han analizado el locus *CYP2D6* y han identificado diferentes mutaciones funcionales en los nueve exones del gen^{29,30}. El 90% de individuos con el fenotipo "pobre metabolizador" presentan las formas alélicas *CYP2D6 A* (*CYP2D6 3*) y/o *B* (*CYP2D6 4*)⁹.

Existe controversia en la asociación del fenotipo "pobre metabolizador" en relación a las formas alélicas mutantes *CYP2D6* y la susceptibilidad a EP, como se refleja en las conclusiones de un estudio de meta-análisis reciente¹⁸. De esta manera, se ha descrito un rango de valores de odds ratios muy diverso para determinadas formas mutantes *CYP2D6*, que apoyan o contradicen la teoría de asociación de este gen con la EP^{18,22}.

La posible correlación entre la presencia de formas alélicas *CYP2D6* y la edad temprana de aparición de los síntomas fue objeto de estudio por Sandy y col²⁵ que no obtuvieron diferencias entre las frecuencias alélicas *CYP2D6 A*, *CYP2D6 B*, *CYP2D6 D* y *CYP2D6 D2* de individuos parkinsonianos jóvenes con respecto al grupo control. La edad de los pacientes incluidos en nuestro estudio es superior a los cincuenta años, por lo que no hemos podido valorar la posible asociación en esta población.

La única forma alélica mutante detectada en nuestra población de estudio ha sido *CYP2D6 4*, pero no existen diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de individuos homocigóticos y heterocigóticos para este genotipo entre los grupos de pacientes y controles. Los alelos mutantes *CYP2D6 3*, *6* y *8* no están representados en nuestra población de estudio.

En conclusión, el fenotipo "pobre metabolizador" para el sistema *CYP2D6* esparteína/debrisoquina no parece estar asociado con EP en la población navarra estudiada, y los alelos normales no parecen contribuir a la protección frente a esta

enfermedad, en concordancia con resultados previos en otras poblaciones^{31,32}.

Actualmente se cuestiona la posible asociación entre el efecto combinado de formas alélicas de distintos genes³³, como el gen del receptor de la dopamina D2 (*DRD2*)³⁴, o aquellos que codifican para enzimas detoxificadoras como las monooxidasas³⁵ y glutatión-transferasas⁹, entre otros, y la EP esporádica idiopática.

La estimación precisa de los riesgos asociados con éstos y otros genes todavía no analizados, así como el análisis de riesgos más complejos generados por las interacciones entre genes e interacciones de genes-medio ambiente requieren la realización de nuevos estudios con grupos de pacientes y controles formados por un mayor número de individuos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los neurólogos y enfermeras encargados de la inclusión y estudio de pacientes y al personal técnico por los estudios de genotipaje. Este trabajo se realizó mediante una subvención del Departamento de Salud (Gobierno de Navarra).

BIBLIOGRAFÍA

1. SEPKOWITZ KA, RAFFALLI J, RILEY L, KIEN TE, ARMSTRONG D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev* 1995;8: 180-199.
1. POEWE WH, WENNING GK. The natural history of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 4: 1-9.
2. BANDMANN O, MARSDEN CD, WOOD NW. Genetic aspects of Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13: 203-211.
3. VELDMAN BA, WIJN AM, KNOERS N, PRAAMSTRA P, HORSTINK MW. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 1998; 100: 15-26.
4. GOLBE LI. Alpha-Synuclein and Parkinson's Disease. *Mov Disord* 1999; 14: 6-9.
5. PERIQUET M, LUCKING C, VAUGHAN J, BONIFATI V, DURR A, DE MICHELE G et al. Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from Founder effects. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 617-626.

6. PICCINI P, BURN DJ, CERAVOLO R, MARAGANORE D, BROOKS DJ. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: Evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol* 1999; 45: 577-582.
7. KRÜGER R, VIEIRA-SAECKER AM, KUHN W, BERG D, MULLER T, KUHN N et al. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined α -synuclein / apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 1999; 45: 611-617.
8. KHAN N, GRAHAM E, DIXON P, MORRIS C, MANDER A, CLAYTON D et al. Parkinson's disease is not associated with the combined α -synuclein/apolipoprotein E susceptibility genotype. *Ann Neurol* 2001; 49: 665-668.
9. DE PALMA G, MOZZONI P, MUTTI A, CALZETTI S, NEGROTTI A. Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease. *Lancet* 1998; 352: 1986-1987.
10. TAN EK, KHAJAVI M, THORNBY JJ, NAGAMITSU S, JANKOVIC J, ASHIZAWA T. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 55: 533-538.
11. MENEGON A, BOARD PG, BLACKBURN AC, MELICK GD, LE COUTEUR DG. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet* 1998; 352: 1344-1346.
12. NEBERT DW, MCKINNON RA, PUGA A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280.
13. COLEMAN T, ELLIS SW, MARTIN IJ, LENNARD MS, TUCKER GT. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4-implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 85-90.
14. ZIV I, MELAMED E. Role of apoptosis in the pathogenesis of Parkinson's disease: A novel therapeutic opportunity? *Mov Disord* 1998; 13: 865-870.
15. JENNER P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13: 124-134.
16. RIEDL AG, WATTS PM, JENNER P, MARSDEN CD. P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. *Mov Disord* 1998; 13: 212-220.
17. SABBAGH N, BRICE A, MAREZ D, DURR A, LEGRAND M, LO GUIDICE JM et al. *CYP2D6* polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Mov Disord* 1999; 14: 230-236.
18. CHRISTENSEN PM, GOTTSCHKE PC, BROSEN K. The sparteine/debrisoquine (*CYP2D6*) oxidation polymorphism and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 473-479.
19. ZANGER UM, VILBOIS F, HARDWICK JP, MEYER UA. Absence of hepatic cytochrome P450b1 causes genetically deficient debrisoquine oxidation in man. *Biochemistry* 1988; 27: 5447-5454.
20. ZHANG ZX, ROMAN CG. Worldwide occurrence of Parkinson's disease, an updated review. *Neuroepidemiology* 1993; 12: 195-208.
21. GOUGH AC, SMITH CA, HOWELL SM, WOLF CR, BRYANT SP, SPURR NK. Localization of the *CYP2D* gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 1993; 15: 430-432.
22. LUCOTTE G, TURPIN JG, GERARD N, PANSERAT S, KRISHAMOORTHY R. Mutation frequencies of the cytochrome *CYP2D6* gene in Parkinson disease patients and in families. *Am J Med Genet* 1996; 67: 361-365.
23. SMITH CA, GOUGH AC, LEIGH PN, SUMMERS BA, HARDING AE, MARAGANORE DM et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992; 339: 1375-1377.
24. HUGHES AJ, DANIEL SE, KILFORD L, LEES AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 181-184.
25. SANDY MS, ARMSTRONG M, TANNER CM, DALY AK, DI MONTE DA, LANGSTON JW et al. *CYP2D6* allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 47: 225-230.
26. SAXENA R, SHAW GL, RELLING MV, FRAME JN, MOIR DT, EVANS WE et al. Identification of a new variant *CYP2D6* allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 923-926.
27. CHAN DKY, WOO J, HO SC, PANG CP, LAW LK, NG PW et al. Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 781-784.
28. HEIM M, MEYER UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 1990; 336: 529-532.
29. ARMSTRONG M, DALY AK, CHOLERTON S, BATEMAN DL, IDLE JR. Mutant debrisoquine

- hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 1992; 339: 1017-1018.
30. TSUNEOKA Y, MATSUO Y, IWAHASHI K, TAKEUCHI H, ICHIKAWA Y. A novel cytochrome P-450IID6 mutant gene associated with Parkinson's disease. *J Biochem (Tokyo)* 1993; 114: 263-266.
31. DIEDERICH N, HILGER C, GOETZ CG, KEIPES M, HENTGES F, VIEREGGE P et al. Genetic variability of the *CYP2D6* gene is not a risk factor for sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996; 40: 463-465.
32. WILHELMSSEN K, MIREL D, MARDER K, BERNSTEIN M, NAINI A, LEAL SM et al. Is there a genetic susceptibility locus for Parkinson's disease on chromosome 22q13?. *Ann Neurol* 1997; 41: 813-817.
33. NICHOLL DJ, BENNETT P, HILLER L, BONIFATI V, VANACORE N, FABBRINI G et al. A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. European Study Group on Atypical Parkinsonism. *Neurology* 1999; 53: 1415-1421.
34. OLIVERI RL, ANNESI G, ZAPPALÀ M. The dopamine D2 receptor gene is a susceptibility locus for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2000; 15: 127-131.
35. CHECKOWAY H, FRANKLIN GM, COSTA-MALLEN P, SMITH-WELLER T, DILLEY J, SWANSON PD et al. A genetic polymorphism of *MAO-B* modifies the association of cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 1998; 50: 1458-1461.