

Aromatische Amine und Blasenkrebsrisiko – welche Rolle spielt der Acetyliererstatus?

Ergebnisse aus der prospektiven EPIC-Kohorte



Beate Pesch, Tobias Weiß, Sylvia Rabstein, Katarzyna Gawrych, Hans-Peter Rihs, Jürgen Angerer, Thorsten Wiethage, Thomas Brüning

In Deutschland erkranken derzeit pro Jahr knapp 29.000 Männer und Frauen an einem Tumor der Harnblase. Aromatische Amine sind seit langem als krebserzeugend für die Harnblase bekannt. Bereits 1895 beobachtete der deutsche Arzt Ludwig Rehn ein gehäuftes Auftreten von Harnblasenkrebs bei Beschäftigten mit Exposition gegenüber aromatischen Aminen. Im Jahr 1936 wurde Harnblasenkrebs in der Folge einer beruflichen Belastung gegenüber kanzerogenen aromatischen Aminen in die Liste der Berufserkrankungen aufgenommen. Aktuell werden pro Jahr etwa 150-170 Fälle als BK 1301 anerkannt. In der vorgestellten Studie wird die Rolle des Acetyliererstatus bei der Entstehung von Harnblasenkrebs untersucht.

Seit Inkrafttreten der GefStoffV 1986 dürfen Gefahrstoffe, die einige der als humankanzerogen eingestuft aromatischen Amine mit einem Massengehalt von gleich oder mehr als 0,1 Prozent enthalten, nicht mehr hergestellt und nicht verwendet werden (2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl und Benzidin). Dies gilt jedoch nicht für die Herstellung und Verwendung, wenn diese Stoffe während einer chemischen Reaktion in einem geschlossenen System entstehen und umgewandelt werden, sodass sie am Ende der Reaktion oder des Arbeitsvorgangs im Endprodukt in einer Konzentration von weniger als 0,1 Prozent vorhanden sind. Noch vor einigen Jahren wurden bei den nachgehenden Untersuchungen von Chemikararbeitern mit beruflicher Exposition gegenüber aromatischen Aminen weitaus mehr Fälle mit Harnblasenkrebs beobachtet, als nach Daten aus dem Saarländischen Krebsregister zu erwarten gewesen wären (Nasterlack et al. 2001). UroScreen, eine aktuelle Früherkennungsstudie in dieser Kohorte von Chemikararbeitern,

zeigt, dass die heute beobachteten Fallzahlen – vermutlich als Folge der Maßnahmen zur Primärprävention – geringer sind als in früheren Jahren (Nasterlack et al. 2011).

Bislang wurden die aromatischen Amine 4-Aminobiphenyl, 2-Naphthylamin, Benzidin und ortho-Toluidin von der Internationalen Krebsagentur als gesicherte Humankanzerogene eingestuft (International Agency for Research on Cancer 2012). Seitens der DFG-Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe ist zusätzlich noch das 4-Chlor-o-toluidin als Humankanzerogen (K1) eingestuft. Darüber hinaus finden sich in den Kategorien K2 – K5 krebserzeugender Arbeitsstoffe aktuell etwa 30 aromatische Amine, von denen viele auch heute noch industrielle Anwendung finden sowie weitere Substanzen, die im Humanmetabolismus zu aromatischen Aminen verstoffwechselt werden können (MAK- und BAT-Werte-Liste 2012). Die entsprechenden Legaleinstufungen fin-

den sich in TRGS 905/906. Auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stehen in Verdacht, Harnblasenkrebs zu erzeugen (Bosetti et al. 2007). Beide Stoffgruppen, aromatische Amine und PAK sind Bestandteile des Tabakrauchs, von Emissionen bei der Heißverarbeitung von Teer und von Kokereiabgasen. Entsprechende Expositionen erhöhen daher das Harnblasenkrebsrisiko.

Rauchen ist derzeit der wichtigste außerberufliche Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasenkrebs. Neben aromatischen Aminen enthält Tabakrauch auch eine Vielzahl anderer krebserzeugender Stoffe. In einer multi-zentrischen deutschen Studie hatten Männer, die 40 oder mehr Packungsjahre geraucht hatten, ein Harnblasenkrebsrisiko von 3,36 (95% KI 2,48-4,56) im Vergleich zu Nierauchern (Pesch et al. 2000). In einer gepoolten Analyse von Fall-Kontroll-Studien hatten aktive Raucher gegenüber Nierauchern ein etwa 4fach erhöhtes relatives Risiko, an Harnblasenkrebs zu erkranken (Puente et al. 2006). Vergleichbare Risiken wurden auch in umfangreichen prospektiven Studien geschätzt (Freedman et al. 2011, Bjerregaard et al. 2006).

Genpolymorphismen können die Enzymfunktion beeinflussen

Die Verstoffwechslung von Fremdstoffen kann zwischen einzelnen Individuen eine erhebliche Variabilität aufweisen. Die am Fremdstoffwechsel beteiligten Enzyme haben in ihrer Gensequenz häufig auftretende „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs), die die Enzymfunktion beeinflussen können. In den 1990er Jahren wurde angenommen, dass einzelne SNPs in metabolischen Genen auch das Krebsrisiko erhöhen können. An der Metabolisierung von Fremdstoffen ist jedoch eine Vielzahl von polymorphen Enzymen beteiligt. Dabei hat sich gezeigt, dass es eine sehr große Zahl von Sequenzvarianten gibt, wobei einzelne SNPs kaum messbare Effekte haben (Garte 2001). Der Polymorphismus der NAT2 im Stoffwechsel aromatischer Amine wurde jedoch weiterhin von vielen Autoren als ein prominentes Beispiel für eine Gen-Umwelt-Interaktion angeführt (Caporaso 2002).

Verstoffwechslung aromatischer Amine

Die Verstoffwechslung aromatischer Amine im menschlichen Körper ist komplex. Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Schema. Daran sind sowohl Phase-I-Enzyme (z.B. CYP1A2) als auch Phase-II-Enzyme (NAT1, NAT2, UGT) beteiligt. Hinsichtlich der krebserzeugenden Wirkung sind insbesondere zwei miteinander konkurrierende Stoffwechselkaskaden von Bedeutung: erstens die durch die beiden *N*-Acetyltransferasen (NAT1 und NAT2) vermittelte *N*-Acetylierung der aromatischen Aminogruppe und zweitens die durch Cytochrom P450 eingeleitete Oxidation der aromatischen Aminogruppe. Im ersten Fall führen eine initiale *N*-Acetylierung und gegebenenfalls daran anschließende Metabolismusschritte zu gut wasserlöslichen Metaboliten, die über die Nieren in den Urin eliminiert werden. Dieser Stoffwechselweg führt zur Entgiftung. Die Phänotypisierung mit dem Kaffee-Test (► S. 22) bewertet diese Entgiftungsleistung, indem sie über das Verhältnis bestimmter Koffein-Metabolite zwischen so genannten langsamen und schnellen Acetylierern differenziert. Dabei wird angenommen, dass bei langsamen Acetylierern relativ

Positiv prädiktiver Wert

Unter einem positiv prädiktiven Wert versteht man den Anteil der Personen mit richtig positivem Ergebnis an der Gesamtzahl aller Personen mit positivem Ergebnis. Somit hängt er wesentlich von der Prävalenz der Erkrankung oder gesundheitlichen Störung ab. Maßgeblich für die Bewertung der klinischen Validität der Untersuchung ist jedoch nicht allein der Betrag des positiv prädiktiven Wertes, sondern auch dessen Verhältnis zum Erkrankungsrisiko vor Durchführung der Untersuchung.

mehr aromatische Amine in den konkurrierenden oxidativen Stoffwechselweg einfließen als bei schnellen Acetylierern. Allerdings kann die Phänotypisierung über den Kaffee-Test keine Aussagen zur individuellen Entgiftungsleistung durch die NAT1 liefern.

In einem zweiten, konkurrierenden Stoffwechselweg stellt die durch die Oxidation der Aminofunktion eingeleitete Kaskade eine Giftingsreaktion dar, da in diesem Pfad kanzerogen in der Harnblase wirkende Metabolite der aromatischen Amine entstehen können. Bei langsamen Acetylierern könnten entsprechend mehr kanzerogen wirkende Metabolite in die Harnblase gelangen. Vor diesem Hintergrund wurde angenommen, dass langsame Acetylierer ein höheres Harnblasenkrebsrisiko besitzen. Eine Untersuchung der Kapazität zur Giftung ist jedoch beim Menschen nicht einfach möglich.

Die aromatischen Amine stellen eine komplexe Gruppe von Verbindungen dar. Der bisher beschriebene Metabolismus, wie er in Abbildung 1 dargestellt ist, gilt nach neueren Erkenntnissen für aromatische Amine mit nur einer Aminogruppe. Das Schema gilt jedoch nicht für aromatische Amine mit zwei Aminofunktionen, zum Beispiel für Benzidin und Benzidinderivate. Hier wird durch die *N*-Acetylierung über die Enzyme NAT1 und NAT2 zunächst nur eine der beiden Aminogruppen zum Mono-*N*-Acetyl-Benzidin verstoffwechselt. Diese Verbindung bildet nach weiteren Stoffwechselschritten an der zweiten Aminogruppe Metabolite, die elektrophile Eigenschaften aufweisen und DNA-Addukte bilden können. Daher entstehen nach Benzidinexposition sowohl höhere DNA-Adduktrate als auch höhere Hämoglobinadduktrate durch diejenigen Benzidin-Metabolite, die an der einen Aminogruppe acetyliert wurden und an der zweiten Aminogruppe oxidativ verstoffwechselt wurden (Rothman et al. 1996, Beyerbach et al. 2006). Die initiale *N*-Acetylierung des Benzidins über die NAT1 und NAT2 führt somit zu einer Aktivierung bzw. Giftung. Daher wird angenommen, dass hier langsame Acetylierer, die gegenüber Benzidin oder Benzidinderivaten exponiert sind, ein geringeres Harnblasenkrebsrisiko besitzen. Aromatische Amine mit lediglich einer Aminogruppe wie zum Beispiel *o*-Toluidin, 2-Naphthylamin oder 4-Aminodiphenyl werden dagegen klassischerweise durch NAT1 und NAT2 entgiftet. In diesem Fall wird, wie bereits beschrieben, angenommen, dass

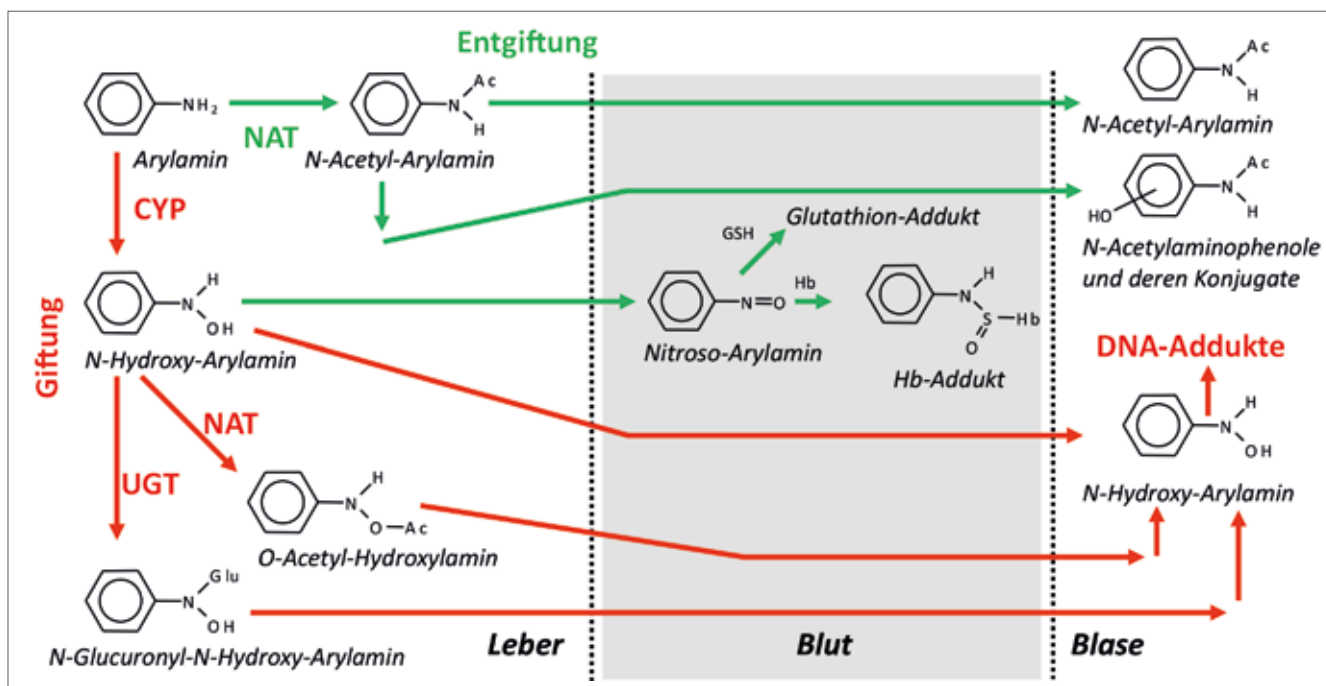


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem komplexen Stoffwechsel aromatischer Amine, hier mit einer Aminofunktion

langsame Acetylierer ein höheres Harnblasenkrebsrisiko besitzen könnten.

Langsame Acetylierer und Harnblasenkarzinom

Bis zur Jahrtausendwende wurden mehrere bevölkerungsbezogene, so genannte „Assoziationsstudien“ durchgeführt, die insgesamt Hinweise auf ein erhöhtes relatives Risiko für langsame Acetylierer gaben, im Vergleich zu schnellen Acetylierern an Harnblasenkrebs zu erkranken (Odds Ratios (ORs) 1,3 - 1,5) (z.B. Marcus et al. 2000, Sanderson et al. 2007).

Erst im Jahr 2005 wurde eine umfangreiche Fall-Kontroll-Studie mit ausreichend großer statistischer Power publiziert (Garcia-Closas et al. 2005). In dieser spanischen Studie wurde ein OR von 1,45 für langsame Acetylierer geschätzt (Tabelle 1). Auffällig war in dieser Studie die Gruppe der Hospitalkontrollen: Der Anteil langsamer Acetylierer war niedriger als in anderen Studien. In einer zweiten umfangreichen Fall-Kontroll-Studie aus den Neu-England Staaten (USA) konnte dagegen nur noch ein OR von 1,04 (95% KI 0,82-1,28) für das Harnblasenkrebsrisiko langsamer Acetylierer im Vergleich mit schnellen Acetylierern ermittelt werden (Moore et al. 2011). Auch eine kürzlich publizierte gepoolte Analyse mehrerer deutscher Fall-Serien und Referenzproben ergab keine Hinweise auf eine Assoziation des Acetyliererstatus mit Harnblasenkrebs (OR 1,02) (Schwender et al. 2012). Bei Studien in verschiedenen Ländern und mit „Mischpopulationen“ ist zu beachten, dass der Unterschied im Anteil langsamer Acetylierer zwischen verschiedenen Ethnien weitaus größer ist als zwischen Kranken und Gesunden (z.B. Sabbagh 2008, Rabstein et al. 2006).

Bisher sind nur wenige Studien zum Acetyliererstatus in umfangreiche prospektive Kohortenstudien eingebettet worden. Kohortenstudien sind weniger anfällig für einen „Selection Bias“ im Vergleich von Erkrankten mit Nichterkrankten als Studien, bei denen Fälle und Kontrollen aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen. Basierend auf relativ kleinen Fallzahlen wurden in der „Nurses' Health Cohort“ (NHC) ein OR von 1,33 (95% KI 0,77-2,31) und in der „Health Professional's Follow-up Study“ (HPFS) ein OR von 0,78 (95% KI 0,53-1,15) geschätzt (McGrath et al. 2006) (vgl. Tabelle 1).

Am IPA konnte erstmals das Risiko für die Entstehung von Harnblasenkrebs in Abhängigkeit vom Acetyliererstatus mit einer größeren Zahl von Fällen im Rahmen der bevölkerungsbasierten „European Prospective Investigation into Cancer und Nutrition“ (EPIC) untersucht werden. Für die in EPIC genestete Fall-Kontroll-Studie konnten 607 Fälle und 695 Kontrollen mit Berufsangaben und DNA-Proben einbezogen werden (z.B. Buchner et al. 2009). EPIC ist mit rund 520.000 Teilnehmern die größte prospektive Studie in der europäischen Bevölkerung (<http://epic.iarc.fr>). Die Auswertung dieser in EPIC genesteten Fall-Kontroll-Studie zeigte, dass der langsame Acetyliererstatus nicht mit einem erhöhten Harnblasenkrebsrisiko assoziiert war (OR 1,02, 95% KI 0,81-1,29) (Pesch et al. submitted).

Zusätzlich wurde am IPA eine Meta-Analyse der aktuellen großen Studien durchgeführt (Tabelle 1). Darin eingeschlossen wurden die Fall-Kontroll-Studien aus Spanien (Garcia-Closas et al. 2005) und den USA (New England) (Moore et al. 2011), die gepoolte Analyse von Schwender et al. (2012) und die in die prospektiven Kohorten NHS, HPFS und EPIC eingebetteten Fall-Kontroll-Studien (McGrath et al. 2006 und Pesch et al. submitted). Danach ergibt sich ein

OR von 1,09 (95% KI 0,92-1,29) für das Harnblasenkrebsrisiko von langsamen Acetylierern im Vergleich zu schnellen Acetylierern. Das geschätzte relative Risiko sinkt jedoch auf 1,01 (95% KI 0,91-1,13), wenn die spanische Studie ausgeschlossen wird.

Zusammenfassend ergeben sich damit aus diesen neueren Studien in beruflich nicht spezifisch belasteten Kollektiven keine überzeugenden Hinweise, dass langsame Acetylierer im Vergleich zu schnellen Acetylierern per se ein erhöhtes Harnblasenkrebsrisiko haben.

Acetylierer-Status und Harnblasenkrebsrisiko – berufliche Exposition

In den 1990er Jahren wurde das Konzept von Gen-Umwelt-Interaktionen entwickelt (Ottman, 1996). Diesem liegt die Annahme zugrunde, dass ein genetischer Polymorphismus insbesondere im Zusammenwirken mit einer Exposition mit einem Erkrankungsrisiko assoziiert sein kann. Insofern stellt sich die Frage, ob langsame Acetylierer in Berufen mit Exposition gegenüber aromatischen Aminen ein erhöhtes Harnblasenkrebsrisiko aufweisen. Dazu gab es erste Hinweise auf einen überproportionalen Anteil langsamer Acetylierer bei Exponierten aus der britischen Farbenherstellung von Cartwright et al. (1982), aber auch in anderen Studien (Golka et al. 2001, Golka et al. 2012). Ein ursprünglich in einem deutschen Benzidin-Kollektiv beobachteter überproportionaler Anteil langsamer Acetylierer (Lewalter und Miksche 1991) konnte in einer späteren Untersuchung von Harnblasenkrebsfällen nicht mehr in dieser Größenordnung bestätigt werden (Golka et al. 1996). Zu beachten ist hier das seit langem bestehende Verbot der Verwendung kanzerogener aromatischer Amine. Weiterhin ist einschränkend zu beachten, dass in den älteren Studien eine Phänotypisierung bereits teilweise schwer erkrankter Blasenkrebsfälle durchgeführt wurde. Heute wird dagegen in Fall-Kontroll-Vergleichen der Genotyp bestimmt, der sich – im Gegensatz zu Metaboliten oder anderen Biomarkern – bei einer Krebserkrankung nicht verändert. Auch die Vergleichskollektive wurden nicht ausreichend repräsentativ ausgewählt. Beispielsweise waren die weiblichen Kontrollen in der britischen Studie im Durchschnitt 30 Jahre jünger als die Fälle. Zudem bestanden bei den in der britischen Farbenherstellung Exponierten offenbar Expositionen nicht nur gegenüber Benzidin sondern zumindest in Teilen auch gegenüber 2-Naphthylamin. Die im Berufsleben erfolgte stoffspezifische Exposition gegenüber aromatischen Aminen wurde bisher noch nicht im Rahmen epidemiologischer Studien abgeschätzt. Auch die statistische Interaktion von Acetyliererstatus und Ausübung von Risikoberufen mit potenzieller Exposition wurde bisher erst ansatzweise untersucht. Von Bedeutung ist eine gepoolte Analyse von acht älteren Studien (Vineis et al. 2001). Unter beruflich möglicherweise gegenüber aromatischen Aminen Exponierten war das Harnblasenkrebsrisiko langsamer Acetylierer statistisch nicht signifikant erhöht (OR 1,50, 95% KI 0,91-2,45). Die in diese Analyse einbezogenen Kontrollen waren überwiegend Hospitalkontrollen oder fehlten in einigen Studien ganz. Berufsangaben waren lediglich in drei Studien vorhanden, und der Raucherstatus oft nur grob erfasst. Aus dieser Analyse wurde seinerzeit gefolgert, dass eine Interaktion des Acetyliererstatus mit Rauchen und Beruf möglich sein kann.

Für die jetzt vom IPA durchgeführte, in die EPIC-Kohorte eingebettete Fall-Kontroll-Studie wurde das Zusammenwirken von Acetyliererstatus und beruflicher Exposition gegenüber aromatischen Aminen bei der Entstehung von Harnblasenkrebs eingehender untersucht. Dazu wurden die Angaben zur Beschäftigung in Risikoberufen und DNA aus archivierten Blutproben genutzt. Die Exposition gegenüber aromatischen Aminen und PAK, einem weiteren möglichen Kausalfaktor für die Entstehung von Harnblasenkrebs, wurde hierbei anhand der Beschäftigung in 52 Risikoberufen und einer semi-quantitativen Job-Expositions-Matrix als niedrig, mittel oder hoch bewertet. Unabhängig vom Acetylierer-Status und adjustiert nach verschiedenen Faktoren, darunter Rauchen, war eine hohe berufliche Exposition sowohl gegenüber aromatischen Aminen (OR 1,37, 95% KI 1,02-1,84) als auch gegenüber PAK (1,50, 95% KI 1,09-2,05) mit einem erhöhten Harnblasenkrebsrisiko assoziiert. In der vom IPA durchgeführten Auswertung fanden sich jedoch keine klaren Hinweise auf eine Effektmodifikation durch den Acetyliererstatus.

Von Bedeutung ist hierbei, dass es sich auch bei der EPIC-Kohorte um eine bevölkerungsbasierte Studie handelt, in die insgesamt nur wenige Hochexponierte eingeschlossen waren. In der Konsequenz ist die Zahl der entsprechend hoch exponierten Harnblasenkrebsfälle vergleichsweise gering. Hinzu kommt, dass in neuerer Zeit weniger beruflich bedingte Harnblasenkrebsfälle auftreten als noch vor einigen Jahren. Auch in der Kohortenstudie UroScreen, die ausschließlich unter Chemikarbeitsern mit Exposition gegenüber aromatischen Aminen durchgeführt wurde, sind weniger Harnblasenkrebsfälle aufgetreten als aufgrund früherer Daten erwartet wurden (Nasterlack et al. 2011). Entsprechend schwierig ist es, bei einem heutzutage relativ geringen Harnblasenkrebsrisiko durch berufliche Exposition noch einen modifizierenden Effekt des Acetyliererstatus zu finden.

Eine Risikomodifikation kann jedoch für spezifische Expositionen beziehungsweise Berufsgruppen nicht ausgeschlossen werden. Das Harnblasenkrebsrisiko von langsamen Acetylierern war beispielsweise bei chinesischen Benzidin-Exponierten signifikant niedriger als bei schnellen Acetylierern (Carreon et al. 2006, Hayes et al. 1993). Benzidin ist, wie bereits beschrieben, ein Aryldiamin mit zwei funktionellen Aminogruppen, das unter anderem für die Herstellung von Azofarben verwendet wurde. Dieser „protektive“ Effekt wurde mit den Unterschieden im Metabolismus von Arylmonoaminen und Aryldiaminen erklärt (Carreon et al. 2006, Rothman et al. 2007). So stellt bei den Aryldiaminen die Mono-Acetylierung einer der beiden Aminofunktionen offenbar eine Aktivierung dar, während die *N*-Acetylierung bei den Arylmonoaminen als Entgiftung anzusehen ist. Auch in der Auswertung am IPA zeigte sich bei Exposition gegenüber Farbstoffen, die eher mit einer Exposition gegenüber Benzidin oder anderen Aryldiaminen verbunden sein kann, zwar ein erhöhtes Harnblasenkrebsrisiko (OR 1,53, 95% KI 1,03-2,28), das jedoch bei langsamen Acetylierern tendenziell etwas niedriger war.

Region	Fall-Kontroll-Design	Quelle	Anzahl Fälle; % langsam	Anzahl Kontrollen; % langsam	OR (95% KI)
Spanien	Retrospektiv Krankenhauskontrollen	Garcia-Closas (2005)	1097 64,5 %	1077 56,1 %	1,45 (1,21 – 1,73)
USA New England	Retrospektiv Bevölkerungskontrollen	Moore (2011)	1081 60,8 %	1264 59,7 %	1,04 (0,82 – 1,28)
USA	Prospektiv, eingebettet in Kohorte mit Krankenschwestern (Nurses' Health Cohort)	McGrath (2006)	63 68,3 %	2652 62,0 %	1,33 (0,77 – 2,31)
USA	Prospektiv, eingebettet in Kohorte mit Gesundheitspersonal (Health Professionals Cohort)	McGrath (2006)	124 57,2 %	1213 61,8 %	0,78 (0,53 – 1,15)
Deutsch- land/Ungarn	Gepoolte Fall-Kontroll-Studie	Schwender (2012)	1588 61,6%	1723 59,6%	1,02 (0,87 – 1,19)
Europa	Prospektiv, eingebettet in European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer (EPIC)		607 64,1 %	695 64,0 %	1,02 (0,81 – 1,29)
Meta-Analyse			4560	8624	1,09 (0,92 – 1,29)
Heterogenität zwischen den Studien $I^2 = 65\%$ $P = 0,01$					
Ohne Spanien $I^2 = 0\%$ $P = 0,60$			3463	7547	1,01 (0,91 – 1,13)

Tabelle 1: Meta-Analyse zum Harnblasenkrebsrisiko von langsamen Acetylierern im Vergleich zu schnellen Acetylierern.

Bestimmung des Acetyliererstatus durch Phänotypisierung

Bei der Untersuchung von Gen-Umwelt-Interaktionen lag bisher der Schwerpunkt der Methodenkritik häufig auf einer unzureichenden Abschätzung der lebenslangen Exposition gegenüber aromatischen Aminen. Aber auch die Abschätzung des Acetyliererstatus hat verschiedene Unsicherheiten. Der Acetyliererstatus kann grundsätzlich durch zwei Ansätze bestimmt werden. Phänotypisch kann der Status unter anderem durch den so genannten „Kaffee-Test“ bestimmt werden. Genetisch kann der Acetyliererstatus durch die Bestimmung von Sequenzvarianten der NAT2 abgeschätzt werden (Deitz et al. 2004).

Der „Kaffee-Test“ ist eine vergleichsweise einfache Methode zur Bestimmung des Acetylierer-Status auf Ebene des Phänotyps. Bei diesem Test werden zwei Metaboliten des Koffeins im Urin quantifiziert. Dabei erlaubt das im Urin vorliegende Verhältnis zwischen dem nicht-acetylierten Metaboliten (1-Methylxanthin) und dem N-acetylierten Metaboliten (5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil) zwischen den beiden Phänotypen „langsamer Acetylierer“ und „schneller Acetylierer“ zu unterscheiden (Grant et al. 1983). Die Übereinstimmung von „Phänotyp“ und „Genotyp“ ist für häufige Allelkombinationen gut (Bolt et al. 2005, Gross et al. 1999). Zu beachten ist jedoch, dass das Verhältnis der beiden Metaboliten innerhalb der „langsamen“ oder „schnellen“ Acetylierer eine erhebliche Schwankungsbreite der individuellen Stoffwechselleistung aufweist. Dagegen ist bisher überwiegend unbekannt, wie die

Giftungs- beziehungsweise Entgiftungsleistung der aromatischen Amine mit den Sequenzvarianten der NAT2 assoziiert ist.

Bisher wurden nur wenige systematische Studien zur Phänotypisierung der NAT2 mit dem „Kaffee-Test“ in der Allgemeinbevölkerung durchgeführt. Die Durchführung des „Kaffee-Tests“ und der „Cut-off“ für die Ermittlung langsamer Acetylierer sind jedoch in einzelnen Studien unterschiedlich.

Eine so genannte „Landmark-Studie“ war die Assoziation von Acetyliererstatus und Harnblasenkrebs anhand der Konzentration von Sulfamethazin und N-Acetylsulfamethazin (nach Sulfamethazingabe) in Urin und Blut von Harnblasenkrebsfällen aus Dänemark und Schweden im Vergleich zu Nichterkrankten (Lower 1979). Die Nichterkrankten wurden unter anderem aus dem Krankenhauspersonal rekrutiert. Eine Adjustierung der Urinkonzentration nach Störfaktoren wie Rauchen ist damals nicht erfolgt. Eine Phänotypisierung ist jedoch nicht uneingeschränkt für bereits Erkrankte geeignet, da die Erkrankung der Blase selbst, ein operativer Eingriff oder die Therapie bei Fällen die Ausscheidung von Metaboliten beeinflussen können.

Bestimmung des Acetyliererstatus durch Genotypisierung

Die Genotypisierung wird heute als gängiges Verfahren zur Ableitung des Acetyliererstatus eingesetzt. Aufgrund der spezifischen Genstruktur (Linkage Disequilibrium) werden bei Europäern zur Bestimmung des Acetyliererstatus auf genetischer

Ebene meist sechs SNPs (rs1041983/282C>T, rs1801280/341T>C, rs1799929/481C>T, rs1799930/590G>A, rs1208/803A>G, rs1799931/857G>A) analysiert (Hein & Doll, 2012). Auch wenigen SNPs weisen eine relativ gute Übereinstimmung zwischen Genotyp und Phänotyp auf, jedoch können dann bis zu 10 Prozent Fehlbestimmungen möglich sein.

In der Vergangenheit wurden meist Genotypisierungsverfahren eingesetzt, die den Genotyp nicht automatisch anzeigen, so dass ein „observer bias“ möglich war. Sie waren aufwändig, hatten einen geringen Probendurchsatz und erlaubten aufgrund der hohen Kosten vielfach keine ausreichenden Doppelbestimmungen. Auf Initiative des IPA hin wurde für die EPIC-Proben ein modernes Hochdurchsatzverfahren genutzt, bei dem der Genotyp automatisch angezeigt wird. Für 1302 EPIC-Probanden wurde der NAT2-Acetyliererstatus aus einem 6-SNP-Genotyp abgeleitet. Dazu wurden 1030 Proben doppelt auf zwei unabhängigen MassARRAY-Plattformen (Sequenom, San Diego, USA) mit hoher Konkordanz $\geq 99,97$ Prozent bestimmt. Nicht konkordante Genotypen wurden am IPA mittels Sequenzierung oder LightCycler-Technologie überprüft. Alle SNPs waren im so genannten Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE). Abweichungen vom HWE zeigen oft eine Genotyp-Fehlbestimmung an (Salanti et al. 2005).

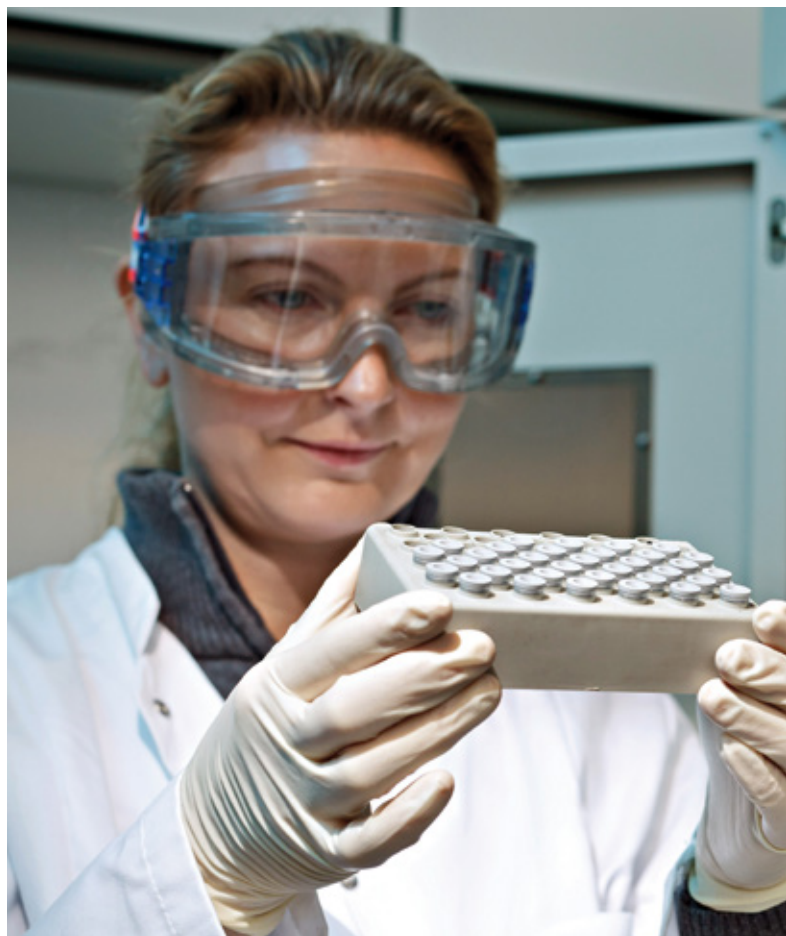
Nur eine Sequenzierung erlaubt letztlich im Einzelfall die eindeutige Zuordnung von Sequenzvarianten zu den Allelen der doppelsträngigen DNA. Werden aber nur spotweise SNPs an einzelnen Positionen der Gensequenz bestimmt, kann bei zwei oder mehr Sequenzvarianten nur noch geschätzt werden, welchem Strang sie zugeordnet werden. Etwa 80 Prozent der Probanden hatten mindestens zwei SNPs, so dass ihre „Allele“ nicht eindeutig bestimmt sind und mit einem statistischen Programm geschätzt wurden. Rund 64 Prozent waren Träger von zwei oder mehr langsamen Allelen entsprechend der NAT Datenbank (Hein et al. 2010) und wurden daher als langsame Acetylierer eingestuft.

Acetyliererstatus und Gendiagnostikgesetz

Die Bestimmung des Acetyliererstatus – auch auf Ebene des Phänotyps mit dem „Kaffee-Test“ ist eine ‚diagnostische genetische Analyse‘ im Sinne des Gendiagnostikgesetzes (GenDG), da die Untersuchung auf die Feststellung genetischer Eigenschaften gerichtet ist. Das GenDG bestimmt unter § 20 Absatz 1, dass im Rahmen arbeitsmedizinischer Vorsorgeuntersuchungen zunächst keine genetischen Untersuchungen oder Analysen vorgenommen werden dürfen. In Absatz 2 jedoch wird eine diagnostische Genproduktanalyse – hierzu muss der „Kaffee-Test“ gezählt werden – dann als zulässig angesehen, wenn genetische Eigenschaften für eine schwerwiegende gesundheitliche Störung mindestens mitursächlich sind. In der am 13.10.2008 als Bundestagsdrucksache 16/10532 veröffentlichten Begründung zum Gesetzentwurf der Bundesregierung für das Gendiagnostikgesetz wird zu § 20 Absatz 2 ausgeführt: „In der Arbeitsmedizin etablierte traditionelle Diagnoseverfahren der Genproduktanalyse zur Aufdeckung arbeitsplatzrelevanter genetisch bedingter individueller Überempfindlichkeiten sollen deshalb zum Wohle der Beschäftigten weiterhin zulässig sein. So führt eine Ex-

position mit aromatischen Aminen in der chemischen Industrie bei Beschäftigten mit einem unterdurchschnittlichen Status an Acetyltransferase-2 („Langsame Acetylierer“) zu einem erhöhten Risiko, an einem Harnblasenkrebs zu erkranken.“

Diagnostische genetische Untersuchungen durch molekulargenetische Analysen, also auf Ebene der DNA, z. B. durch die Genotypisierung haben zwar im Falle der Bestimmung des Acetyliererstatus gegenüber der Phänotypisierung eine deutlich höhere Qualität, er-



fordern aber nach dem GenDG eine gesonderte Rechtsverordnung der Bundesregierung, für die wiederum verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein müssen. In der vorgenannten Begründung zum Gesetzentwurf wird hierzu angemerkt, dass sich in der arbeitsmedizinischen Wissenschaft noch keine konkreten Anwendungsfelder für molekulargenetische oder unmittelbare DNA-/RNA-Untersuchungsmethoden abzeichnen.

Prädiktiver Wert des Acetyliererstatus

In der Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission (GEKO) für die Beurteilung genetischer Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bedeutung für Erkrankungen, die am 27.07.2012 veröffentlicht wurde, wird für die Beurteilung des klinischen Nutzens der Untersuchung einer genetischen Eigenschaft ausgeführt, dass die Aussagekraft der Untersuchung in erster Linie hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

sowie dem positiven und negativen prädiktiven Wert abzuschätzen ist. Dies gilt sowohl für Untersuchungen durch molekulargenetische Analysen als auch für Genproduktanalysen (Gendiagnostik Kommission 2013).

Für langsame Acetylierer würde das konkret bedeuten, dass eine weitaus größere Zahl beruflich Exponierter an Harnblasenkrebs erkranken müssten als unter schnellen Acetylierern. Es gibt bisher jedoch noch keine Studie, die diesen positiven prädiktiven Wert (PPV) (s. Infokasten) für den Acetyliererstatus und die Entstehung von Harnblasenkrebs bestimmt hat. Prädiktive Werte für die zukünftige Entstehung von Harnblasenkrebs können nur in prospektiven Längsschnittstudien ermittelt werden, bei denen alle Probanden zum Zeitpunkt der Rekrutierung gesund sind. Eine solche Studie war die „European Prospective Investigation into Cancer und Nutrition“ (Riboli et al. 2002). Häufig werden jedoch nur genestete Fall-Kontroll-Studien durchgeführt, da es aus Kostengründen meist nicht möglich ist, mehrere hunderttausend Kohortenmitglieder zu genotypisieren. Der PPV einer langsamen Acetylierung kann daher nicht direkt ermittelt werden.

Odds Ratios sind jedoch nur ein Maß für die Assoziation von „Markern“ mit der Erkrankung und geben keine Auskunft darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein langsamer Acetylierer später einen Harnblasenkrebs entwickeln wird. Ein relatives Risikomaß ist nicht hinreichend aussagekräftig für einen genetischen Test oder ein Screening (Kraft et al. 2009). Das Risiko einer späteren Erkrankung ist auch von der Krebsinzidenz abhängig, wobei Harnblasenkrebs eine gegenüber Lungen-, Darm- oder Brustkrebs geringere Inzidenz aufweist. Selbst für Tumortests wie UroVysion™, die eng mit der Entstehung von Harnblasenkrebs assoziiert sind, erreicht der PPV nur 16 Prozent (Banek et al. 2012).

Schlussfolgerungen

In der am IPA durchgeführten Analyse, die in eine große bevölkerungsbasierte Längsschnittstudie eingebettet war, konnte keine signifikante Assoziation des Acetyliererstatus mit der Entstehung von Harnblasenkrebs beobachtet werden. Obwohl nicht für alle EPIC-Probanden ein Acetyliererstatus bestimmt wurde und man prinzipiell nicht ausschließen kann, dass es empfindliche berufliche Subgruppen geben könnte, ist davon auszugehen, dass der positive prädiktive Wert des langsamen Acetyliererstatus bei weitem nicht ausreicht, um damit einen genetischen Test als Präventivmaßnahme für Beschäftigte zu begründen. Auch für die Anerkennung und Kompensation von beruflich bedingtem Harnblasenkrebs ist weder eine ethische Rechtfertigung noch eine ausreichend belastbare wissenschaftliche Grundlage gegeben, hierbei den Acetyliererstatus zu berücksichtigen. Mit dieser Studie wurde der bereits früher geäußerte Standpunkt untermauert, dass ein Screening von beruflich Exponierten auf genetische Varianten in Enzymen des Fremdstoffwechsels nicht durchgeführt werden sollte (Brüning et al. 2004; Vineis & Schulte 1995). Die hier vorgestellten Ergebnisse können daher auch eine Grundlage für eine diesbezügliche Weiterentwicklung des DGUV Grundsatz 33 bieten.

Eine wissenschaftliche Untersuchung komplexer Gen-Umwelt-Interaktionen ist weiterhin ein wichtiger Forschungsansatz, der jedoch nur in großen Konsortien und mit modernsten molekularbiologischen und statistischen Verfahren möglich ist. Statt einzelne SNPs zu untersuchen, werden heutzutage genomweite Analysen in internationalen Konsortien mit DNA-Proben von zehntausenden Personen durchgeführt. Diese genomweiten Analysen sind auch geeignet, einen Hypothesen-gesteuerten „Publication-Bias“ zu vermeiden. Während die Analyse komplexer genetischer Daten große Fortschritte zeigt, bleibt die zuverlässige Abschätzung der lebenslangen stoffspezifischen Exposition von Probanden eine besondere arbeitsmedizinische Herausforderung für die Untersuchung von genetischer Suszeptibilität.

Zusammenfassend ist der langsame Acetyliererstatus bei der Entstehung von Harnblasenkrebs ein prominentes Beispiel dafür, dass man darauf achten sollte, keine Schlussfolgerungen über das Krebsrisiko in Verbindung mit einem genetischen Test zu ziehen, bevor ausreichend belastbare Studien, insbesondere mit einem prospektiven Studiendesign durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zum Harnblasenkrebsrisiko aus dieser umfangreichen bevölkerungsbezogenen Kohortenstudie und in Kombination mit anderen neueren Studien zeigen, dass der Acetyliererstatus keinen erkennbaren Einfluss auf die Entstehung von Harnblasenkrebs in der heutigen Allgemeinbevölkerung hat. Seine Rolle in speziellen beruflichen Kollektiven sollte in prospektiven Industriekohorten eingehender ermittelt werden. Hier stellt sich jedoch das Problem, aufgrund der heute geringeren Harnblasenkrebsinzidenz ausreichend Fälle zu finden, um dies belastbar nachzuweisen.

Die Autoren

Prof. Dr. Jürgen Angerer, Prof. Dr. Thomas Brüning,
Katarzyna Gawrych, PD Dr. Beate Pesch, Dr. Sylvia Rabstein,
Dr. Hans-Peter Rihs, Dr. Tobias Weiß, Dr. Thorsten Wiethege

IPA

Beitrag als PDF



Eine ausführliche Literaturliste sowie den Artikel im PDF-Format finden Sie im Internet unter:
www.ipa-dguv.de Webcode: 589824

Literatur

- Banek S, Schwentner C, Taeger D, Pesch B, Nasterlack M, Leng G, Gawrych K, Bonberg N, Johnen G, Kluckert M, Sievert KD, Brüning T, Stenzl A: Prospective evaluation of fluorescence-in-situ-hybridization to detect bladder cancer: Results from the UroScreen-study. *Urol Oncol* 2012; Epub ahead of Print
- Beyerbach A, Rothman N, Bhatnagar VK, Kashyap R, Sabbioni G. Hemoglobin adducts in workers exposed to benzidine and azo dyes. *Carcinogenesis*. 2006;27:1600-1606
- Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Frederiksen K, Christensen J, Tjonneland A, ..., Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Kiemeneij L, Gram IT, Braaten T, Lund E, Gonzalez CA, Berglund G, Allen N, Roddam A, Bingham S, Riboli E: Tobacco smoke and bladder cancer - in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2006; 119: 2412-2416
- Bolt HM, Selinski S, Dannappel D, Blaszkewicz M, Golka K: Re-investigation of the concordance of human NAT2 phenotypes and genotypes. *Arch Toxicol* 2005; 79: 196-200
- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C: Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol* 2007; 18: 431-446
- Brüning T, Giesen T, Harth V, Ko Y, Leng G, Lewalter J, Pesch B: Bewertung von Suszeptibilitätsmarkern in der Arbeits- und Umweltmedizin. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2004; 39: 4-11
- Buchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, ..., Ehrnstrom RA, Hallmans G, Ljungberg B, Allen NE, Roddam AW, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Boffetta P, Jenab M, Mouw T, Michaud DS, Kiemeneij LA, Riboli E: Consumption of vegetables and fruit and the risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2009; 125: 2643-2651
- Caporaso NE: Why have we failed to find the low penetrance genetic constituents of common cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1544-1549
- Carreon T, Ruder AM, Schulte PA, Hayes RB, Rothman N, Waters M, Grant DJ, Boissy R, Bell DA, Kadlubar FF, Hemstreet GP, III, Yin S, LeMasters GK: NAT2 slow acetylation and bladder cancer in workers exposed to benzidine. *Int J Cancer* 2006; 118: 161-168
- Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA: Role of *N*-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet*. 1982; 2(8303):842-845
- Deitz AC, Rothman N, Rebbeck TR, Hayes RB, Chow WH, Zheng W, Hein DW, Garcia-Closas M: Impact of misclassification in genotype-exposure interaction studies: example of *N*-acetyltransferase 2 (NAT2), smoking, and bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1543-1546
- Freedman ND, Silverman D, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abent C: Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011; 306: 737-745
- Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, ... Fernandez F, Real FX, Rothman N: NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005; 366: 649-659
- Garte S: Metabolic susceptibility genes as cancer risk factors: time for a reassessment? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1233-1237
- Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Cascorbi I, Schöps W, Kierfeld G, Roots I, Bolt HM: Occupational history and genetic *N*-acetyltransferase polymorphism in urothelial cancer patients of Leverkusen, Germany. *Scand J Work Environ Health* 1996; 22:332-338
- Golka K, Weistenhofer W, Jedrusik P, Geller F, Blaszkewicz M, Bolt HM: *N*-acetyltransferase 2 phenotype in painters with bladder cancer and controls. *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30:464-467
- Golka K, Roemer HC, Weistenhöfer W, Blaszkewicz M, Hammad S, Reckwitz T, Loehlein D, Hartel M, Hengstler JG, Geller F: *N*-Acetyltransferase 2 and glutathione *s*-transferase M1 in colon and rectal cancer cases from an industrialized area. *J Toxicol Environ Health A* 2012; 75: 572-581
- Grant DM, Tang BK, Kalow W. Polymorphic *N*-acetylation of a caffeine metabolite. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 33: 355-359
- Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, DeLongchamp R, Kadlubar F: Distribution and concordance of *N*-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 683-692
- Hayes RB, Bi W, Rothman N, Broly F, Caporaso N, Feng P, You X, Yin S, Woosley RL, Meyer UA: *N*-acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers. *Carcinogenesis* 1993; 14: 675-678
- Hein DW, Sim E, Boukouvala S, Grant DM, Minchin R: Consensus Human Arylamine *N*-Acetyltransferase Gene Nomenclature. University of Louisville School of Medicine 2010
- Hein DW, Doll MA: Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes. *Pharmacogenomics*. 2012; 13: 31-41
- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC 2012
- Kraft P, Wacholder S, Cornelis MC, Hu FB, Hayes RB, Thomas G, Hoover R, Hunter DJ, Chanock S: Beyond odds ratios--communicating disease risk based on genetic profiles. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 264-269
- Lewalter J, Miksche W: Empfehlungen zur arbeitsmedizinischen Prävention expositions- und dispositionsbedingter Arbeitsstoff-Beanspruchungen. Verhandlg 31. Jahrestagung DGAUM 1991; 135-139

- Lower GM, Nilsson T, Nelson CE, Wolf H, Gamsky TE, Bryan GT: *N*-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Env Health Persp* 1979; 29: 71-79
- Marcus PM, Vineis P, Rothman N : NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics* 2002; 10: 115-122
- McGrath M, Michaud D, De V, I (2006) Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer* 2006; 6: 23
- Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, K..., Cantor KP, Silverman DT, Rothman N: GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis* 2011; 32: 182-189
- Nasterlack M, Scheuermann B, Messerer P, Pallapies D, Zober A: Harnblasenkrebs in einem Risikokollektiv - Klinische und epidemiologische Aspekte. *Symp Med* 2001; 12; 17-18
- Nasterlack M, Feil G, Leng G, Pesch B, Huber S, Sievert KD, Johnen G, Taeger D, Mayer T, Kluckert M, Brüning T, Stenzl A: Bladder cancer screening with urine-based tumour markers - occupational medical experience. *Aktuell Urol* 2011; 42: 128-134
- Ottman R: Gene-environment interaction: definitions and study designs. *Prev Med* 1996; 25: 764-770
- Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschläger B, Schill W, MURC Study Group: Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. *Int J Epidemiol* 2000; 29: 1014-1024
- Pesch B, Gawrych K, Rabstein S, Weiß T, Casjens S, Rihs HP, Ding H, Angerer J, Illig T, Klopp N, Bueno-de-Mesquita B, Ros M, Kaaks R, Chang-Claude J, ... Romieu I, Brüning T, Vineis P: NAT2 acetylator phenotype, occupation and bladder cancer risk: Results from the EPIC cohort. *Epidemiol, Biomarkers & Prev* 2013; submitted
- Puente D, Hartge P, Greiser E, Cantor KP, King WD, Gonzalez CA, Cordier S, Vineis P, Lynge E, Chang-Claude J, Porru S, Tzou A, Jöckel KH, Serra C, Hours M, Lynch CF, Ranft U, Wahrendorf J, Silverman D, Fernandez F, Boffetta P, Kogevinas M: A pooled analysis of bladder cancer case-control studies evaluating smoking in men and women. *Cancer Causes Control* 2006; 17: 71-79
- Rabstein S, Unfried K, Ranft U, Illig T, Kolz M, Rihs HP, Mambetova C, Vlad M, Bruning T, Pesch B: Variation of the *N*-acetyltransferase 2 gene in a Romanian and a Kyrgyz population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 138-141
- Rehn L (1895) Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. *Archiv für Klinische Chirurgie* 50: 588-600
- Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, Charrondiere UR, Hemon B, Casagrande C, ..., Day NE, Key TJ, Kaaks R, Saracci R: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002; 5: 1113-1124
- Rothman N, Garcia-Closas M, Hein DW: Commentary: Reflections on G. M. Lower and colleagues' 1979 study associating slow acetylator phenotype with urinary bladder cancer: meta-analysis, historical refinements of the hypothesis, and lessons learned. *Int J Epidemiol* 2007; 36: 23-28
- Rothman N, Bhatnagar VK, Hayes RB, Zenser TV, Kashyap SK, Butler MA, Bell DA, Lakshmi V, Jaeger M, Kashyap R, Hirvonen A, Schulte PA, Dosemeci M, Hsu F, Parikh DJ, Davis BB, Talaska G: The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:5084-5089
- Sabbagh A, Langaney A, Darlu P, Gérard N, Krishnamoorthy R, Poloni ES: Worldwide distribution of NAT2 diversity: implications for NAT2 evolutionary history. *BMC Genet*. 2008 27; 9:21
- Salanti G, Amountza G, Ntzani EE, Ioannidis JP: Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 840-848
- Sanderson S, Salanti G, Higgins J: Joint effects of the *N*-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis. *Am J Epidemiol*. 2007; 1; 166: 741-51
- Schwender H, Selinski S, Blaszkewicz M, Marchan R, Ickstadt K, Golka K, Hengstler JG: Distinct SNP combinations confer susceptibility to urinary bladder cancer in smokers and non-smokers. *PLoS One*. 2012; 7(12): e5188
- Trepanier LA, Ray K, Winand NJ, Spielberg SP, Cribb AE (1-7-1997) Cytosolic arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes. *Biochem Pharmacol* 54: 73-80
- Vineis P, Marinelli D, Autrup H, Brockmoller J, Cascorbi I, Daly AK, Golka K, Okkels H, Risch A, Rothman N, Sim E, Taioli E: Current smoking, occupation, *N*-acetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1249-1252
- Vineis P, Schulte PA: Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers for cancer risk: the case of the *N*-acetyltransferase phenotype. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 189-197