

Magdalena ARNDT¹
 Damian BRAUZE¹
 Wojciech GAWĘCKI²
 Krzysztof SZYFTER^{1,2}

Wpływ polimorfizmu Arg554Lys w genie AHR na przeżywalność chorych na płaskonabłonkowego raka krtani w kontekście ekspozycji na dym tytoniowy – badania wstępne

Significance of Arg554Lys AHR gene polymorphism on survival of in squamous cell carcinoma laryngeal cancer in relation to tobacco smoking – preliminary study

¹Zakład Mutagenyzy Środowiskowej, Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań
 Kierownik: Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter

²Katedra Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
 Kierownik: Prof. dr hab. med. Witold Szyfter

Dodatkowe słowa kluczowe:

rak krtani
 palenie tytoniu
 polimorfizm genu AHR.

Additional key words:

laryngeal cancer
 tobacco smoking
 AHR gene polymorphism

Pracę finansowano z grantu MNSzW
 N 401 105 32 / 2154

O wystąpieniu i przebiegu raka krtani decyduje palenie tytoniu, nadużywanie mocnych napojów alkoholowych oraz nie do końca zdefiniowany czynnik genetyczny. Celem pracy była ocena wpływu polimorfizmu genu AHR na przeżywalność chorych leczonych z powodu płaskonabłonkowego raka krtani. Materiał do badań stanowiło 65 archiwalnych próbek DNA. Technika RFLP-PCR oceniano obecność wariantów polimorficznych genu AHR. W przypadku wykrycia odmiennej ruchliwości elektroforetycznej próbkę poddawano sekwencjonowaniu DNA. Obecność polimorfizmu Arg554Lys (kodon 554) stwierdzono dla 9 przypadków zawsze w układzie heterozygotycznym. W jednym przypadku poza mutacją 554 wykryto także dwie inne w kodonach: 490 (1468 A>G) oraz 570 (1708 G>A). Porównano długość przeżycia, wystąpienie przerzutów i drugich pierwotnych nowotworów u nosicieli genu dzikiego i nosicieli wariantu Arg554Lys genu AHR. Wstępne wyniki wskazują na celowość dalszych badań opartych o większą liczbę przypadków, bowiem grupa analizowana do tej pory jest zbyt małą liczbowo.

Initiation and progression of laryngeal cancer is associated with tobacco smoking and abusing of strong alcoholic beverages. A significance of genetic factor, although not defined sufficiently yet has been raised as well. The studies were focused on an influence of AHR gene polymorphism on survival of squamous cell carcinoma laryngeal subjects. The study material was 65 archival DNA samples analyzed by RFLP-PCR. The samples varying with electrophoretic mobility were DNA sequenced. In the study group 9 heterozygotic variants Arg554Lys (codon 554) were detected. One case was a carrier of two other mutations in codon: 490 (1468 A>G) and 570 (1708 G>A). Survival time, metastasis and occurrence of second primary tumors were compared in carriers of wild type and Arg554Lys variant AHR. Preliminary results indicate for a necessity of further studies as until now the study group is too small to find a conclusive association.

Wstęp

Ekspozycja na kancerogeny zawarte w dymie tytoniowym wiąże się z powstawaniem nowotworów w obrębie eksponowanych regionów: głównie dróg oddechowych [31]. Jednocześnie wiadomo, że jedynie mniejsza część grupy ryzyka rozwija nowotwór. Predyspozycja na poziomie genetycznym jest, więc oczekiwana. Genetyczne różnicowanie populacji ludzkiej wskazuje na celowość podejmowania badań nad indywidualną podatnością na działanie czynników rakotwórczych. Wyodrębnienie poszczególnych polimorfizmów genetycznych pozwala wskazać genotyp szczególnie predysponujący do powstania określonego rodzaju raka.

Do tej pory większość badań w obrębie

podłoża genetycznego raka krtani ogniskowała się wokół genów aktywacji i detoksykacji kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym a także genów dla enzymów naprawy uszkodzeń DNA. Klasyfikuje się je jako „geny niskiej penetracji”, wykazujące niewielki, ale mierzalny wpływ na zmianę ryzyka wystąpienia nowotworu. Zgodnie z obecnymi poglądami dopiero zaistnienie określonej kombinacji wariantów genowych istotnie przyczynia się do wzrostu ryzyka genetycznego. W związku z tym, że kancerogeny dymu tytoniowego oraz inne ksenobiotyki charakteryzuje w dużej mierze hydrofobowość, polarność oraz niska reaktywność nie mogą być one usuwane z organizmu w swojej pierwotnej postaci, ale wymagają metabolicznej przemiany do form roz-

Adres do korespondencji:

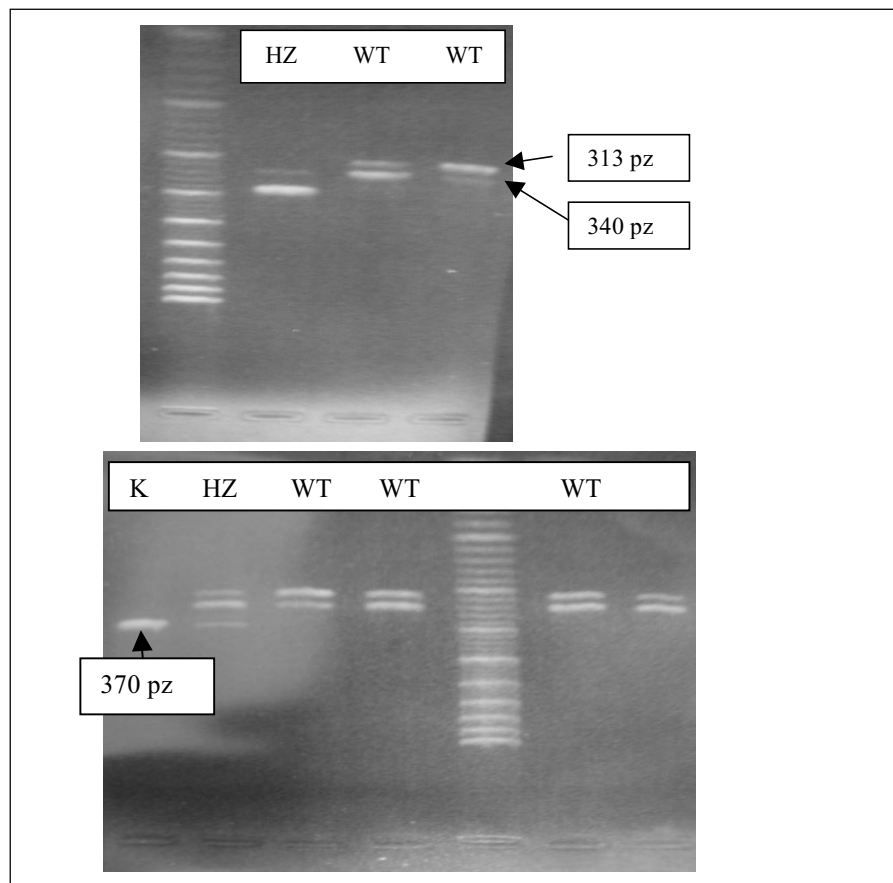
mgr Magdalena Arndt
 Zakład Mutagenyzy Środowiskowej
 Instytut Genetyki Człowieka PAN
 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32
 Tel. (+61) 657 92 16; Fax. (+61) 823 32 35
 e-mail: madlen.arndt@wp.pl

puszczalnych a tym samym możliwych do wydalania. Biotransformacja tych substancji przebiega w dwóch etapach: I faza metabolizmu (aktywacja metaboliczna) – zaangażowane w nią układy enzymatyczne, głównie enzymy z rodziny cytochromu P-450, prowadzą reakcje w kierunku lepiej rozpuszczalnych i łatwiej wydalanych cząstek. II fazie stanowi właściwa detoksykacja. Większość enzymów biorących udział w procesach aktywacji i detoksykacji to białka adaptatywne, tzn. takie, których ekspresja może być indukowana przez czynniki zewnętrzne. W przypadku jednej z najważniejszych grup kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym - węglowodorów aromatycznych – takim czynnikiem jest cytoplazmatyczny receptor Ah (*aryl hydrocarbon*).

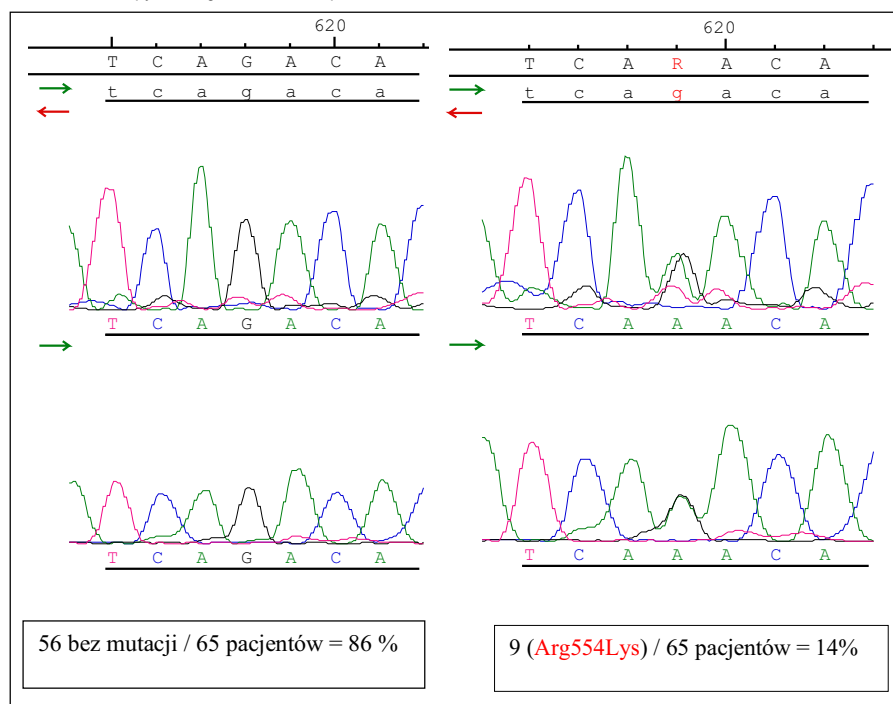
Modelowe prace nad podatnością na kancerogenne działanie węglowodorów aromatycznych umożliwiły zidentyfikowanie locus Ah u myszy [20]. Zróżnicowana podatność szczepów różniących się allelami tego locus na kancerogenne działanie węglowodorów aromatycznych wiąże się z kontrolą indukcji enzymów metabolizujących węglowodory aromatyczne (benzo(a)piren) przez locus Ah. Prowadzi to między innymi do kilkunastokrotnych różnic w ilości tworzonych adduktów benzo(a)pirenu do DNA [4,29]. Podjęte prace umożliwiły zidentyfikowanie produktu białkowego kodowanego w tym locus jako cytoplazmatycznego receptora Ah [24] a następnie jego izolację i poznanie sekwencji białkowej [7].

Receptor Ah jest czynnikiem transkrypcyjnym, który po związaniu z ligandem ulega translokacji z cytoplazmy na teren jądra komórkowego a następnie dimeryzując z białkiem Arnt rozpoznaje specyficzne sekwencje w odcinkach promotorowych wrażliwych genów prowadząc do ich transkrypcji [24]. Receptor ten jest silnie zakonserwowany ewolucyjnie i występuje u wszystkich badanych zwierząt, co sugeruje jego udział w swego rodzaju podstawowych, niezbędnych dla przeżycia funkcjach. Spora grupa dotąd poznanych enzymów indukowanych przez receptor Ah zaangażowanych jest w procesy detoksykacji i aktywacji kancerogenów. Należą tu z enzymów I fazy detoksykacji cytochromy P450: 1A1, 1A2, 1B1 i 2S1 oraz z enzymów II fazy – transferaza glutationu Ya, dehydrogenaza aldehydów 3, DT-diaforaza i UDP-glukuronyltransferaza. Z innych białek regulowanych przez receptor wymienić należy AhRR, białko będące represorem tego receptora stanowiącym element ujemnego sprzężenia zwrotnego wyciszającego procesy, w których uczestniczy receptor Ah oraz białka zaangażowane w proliferację komórek (TGF-β, IL-1β i PAI-2), białka regulujące cykl komórkowy (p27 i jun-B) jak również białko Bax regulujące apoptozę. Do białek regulowanych przez receptor należy również opisane przez nas białko wiążące β-naftoflawn, będące przypuszczalnie białkiem transportowym [2,3].

Brak indukcji enzymów aktywujących węglowodory aromatyczne u myszy z wyłączonym receptorem Ah warunkuje całkowitą odporność tych myszy na kancerogenne działanie benzopirenu [28]. Istnieje



Rycina 1
Wyniki trawienia produktów PCR enzymem Hpy 188I.
Results of the Hpy188I digestion of PCR products.



Rycina 2
Graficzny obraz wyników sekwencjonowania produktów PCR.
Results of sequencing of PCR products.

również wiele dowodów na to, że receptor Ah pośredniczy w prawie wszystkich toksycznych i kancerogennych efektach działania wielu innych związków, w tym TCDD (dioksyny).

Dysponując takimi obserwacjami uży-

skanymi w oparciu o model zwierzęcy, zaczęto badać korelację między zapadalnością na tytoniozależne nowotwory a występowaniem polimorficznych form receptora u ludzi. Jak dotąd udało się zidentyfikować kilka polimorfizmów w obrębie genu AHR.

Tabela I

Wyniki rozkładu polimorfizmu w obrębie badanej grupy chorych na raka krtani.

Preliminary results of the distribution of Arg554Lys polymorphism in laryngeal cancer cases.

n	Mutacja Lys554Arg	Zgon (przyczyna nowotworowa)	SNP	Przerzuty
Σ= 65	9	12	11	1
WT	56	11	11	–
HZ [Arg554 Lys]	9	1	3	–

Najpowszechniejszym i najczęściej badanym jest polimorfizm receptora Ah w kodonie 554 w eksonie 10 (1661G>A), którego rezultatem jest zamiana w sekwencji białkowej aminokwasu argininy na lizynę. Udokumentowano silny związek między polimorfizmem w kodonie 554 receptora Ah a przeżywalnością pacjentów z mięsakami tkanek miękkich [1]. Równocześnie, podobnie jak w przypadku innych badań nie obserwowano asocjacji tego polimorfizmu z zaistnieniem choroby nowotworowej, co sugeruje zupełnie inny mechanizm działania niż indukcja enzymów metabolizujących kancerogeny. Była to obserwacja zupełnie nowa i nieoczekiwana, ponieważ dotychczas koncentrowano się wyłącznie na korelowaniu występowania polimorfizmów receptora Ah z inicjacją procesu nowotworowego. W świetle regulacji przez receptor Ah także białek zaangażowanych w proliferację i apoptozę komórek, ewentualny wpływ polimorfizmów tego genu na tempo rozwoju nowotworu czy też skuteczność zastosowanej terapii byłby prosty do wytłumaczenia. Pomimo znacznych różnic w charakterystyce obu grup nowotworów (mięśaki, płaskonabłonkowe) istniała spora szansa, że zjawisko modulacji przeżycia przez warianty genetyczne receptora Ah będzie miało charakter uniwersalny, właściwy także dla nowotworów innych niż mięśaki.

Celem nadrzędnym naszych badań było określenie zależności między występowaniem polimorfizmów receptora Ah (szczególnie w kodonie 554) a przeżywalnością osób z płaskonabłonkowymi rakami krtani. W dalszej perspektywie wykazanie korelacji między allelami receptora Ah a długością przeżycia z płaskonabłonkowym rakiem krtani mogłoby pomóc klinicytom w doborze sposobu terapii (radykałnej, paliatywnej etc.). Dodatkowym celem badań była możliwość wykazania korelacji znalezionych polimorfizmów receptora Ah z zaistnieniem (inicjacją) choroby nowotworowej. Tego typu badania nigdy nie były podejmowane w przypadku płaskonabłonkowych raków krtani a znajdują uzasadnienie z uwagi na silną zależność tego typu nowotworów od ekspozycji na węglowodory aromatyczne dymu tytoniowego. Trzecim celem badań było znalezienie ewentualnych nowych polimorfizmów w obrębie genu kodującego receptor Ah jak również poznanie częstości występowania poszczególnych polimorfizmów tego receptora w populacji polskiej.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiła archiwalna kolekcja DNA pacjentów leczonych z powodu występowania płaskonabłonkowych raków krtani w Klinice Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie/ na przestrzeni: 2000-2002. Analizą objęto 65 prób pochodzących z krwi pacjentów. Wśród pacjentów zakwalifikowanych do badań przeprowadzono wywiad środowi-

skowy uzyskując takie informacje jak: wiek, wykonywany zawód, czynne/bierne palenie, rodzaj i ilość spożywanego alkoholu a także informacje na temat stanu zdrowia pacjenta i przebiegu leczenia.

W grupie tej 97% stanowili mężczyźni w wieku 39-79 lat (średnia 59 lat) a 3%-kobiety (średni wiek 55 lat). Ocenę zaawansowania nowotworu przeprowadzono według klasyfikacji TNM. Najczęściej obserwowaną cechą w grupie kobiet był fenotyp T3N1M0, natomiast w grupie mężczyzn najczęstszym stadium w momencie diagnozy był T3N0M0. Nowotwór był zlokalizowany w górnym piętrze krtani u ponad 50% pacjentów. W grupie mężczyzn zabiegie laryngektomii całkowitej dokonano dla 54 przypadków; w grupie kobiet laryngektomii całkowitej nie przeprowadzono.

Materiał do badań stanowiła próba 10 ml krwi obwodowej pobranej na EDTA. Izolację DNA prowadzono z wykorzystaniem standardowej metody ekstrakcji w obecności fenolu i chloroformu oraz precipitacji alkoholem etylowym. Wyizolowane DNA przechowywano w warunkach -20°C.

Analizę polimorfizmu Arg554Lys w obrębie genu AHR przeprowadzono z wykorzystaniem techniki PCR RFLP (enzym Hpy 188I) oraz sekwencjonowania produktów PCR. Profil warunków reakcji PCR przedstawiał się następująco: denaturacja wstępna: 95°C, 5 min; denaturacja: 95°C, 30 sek.; wiązanie starterów: 60°C, 30 sek.; synteza DNA: 72°C, 45 sek.; x 32 cykle; synteza końcowa: 72°C, 10 min; 4°C. Stosując specyficzne zaprojektowane startery (hAhr-Up: CTCTCAATCCTAGT-TCCCTCCTG oraz hAhr-Lo: ATCCGTTAAGTCA-ATGCTCTG) amplifikowano w reakcji PCR fragment sekwencji zawierający miejsce polimorficzne o długości 389 pz. Próby poddawano następnie hydrolizie enzymem Hpy 188I (New England Biolabs) specyficznie rozpoznającym układ par zasad dla wariantu polimorficznego. Różnice migracji elektroforetycznej w 2,5% żelu agarozowym wskazywały na obecność wystąpienia polimorfizmu. Dla potwierdzenia jego obecności produkty PCR poddawano sekencjonowaniu DNA.

Wyniki

Obecność polimorfizmu Arg554Lys w grupie 65 pacjentów z rakiem krtani stwierdzono w 9 przypadkach. W przypadku zaistnienia mutacji każdorazowo obserwowanym wariantem był układ heterozygotyczny (częstość zmutowanego allelu: 0,07). W jednym przypadku (pacjent nr 120) poza mutacją 554 wykryto także dwie inne w kodonach: 490 (1468 A>G) oraz 570 (1708 G>A). Pierwsza z nich, dotycząca kodonu 490 nie została do tej pory opisana w literaturze. Przykładowe wyniki rozdziału elektroforetycznego przedstawia rycina 1.

Spśród dziewięciu przypadków obciążonych polimorfizmem Arg554Lys tylko jeden pacjent zmarł na skutek wznowy lokalnej (lokalizacja w nasadzie języka). Dla dwóch z grupy pozostałych ośmiu zaobserwowano wznowy o charakterze lokalnym.

Ogółem w grupie 65 pacjentów zgon nastąpił w 16 przypadkach, z czego dla czterech z nich przyczyna nie jest znana. Pozostała liczba przypadków tj. 12 dotyczy zgonów na skutek nawrotu choroby nowotworowej – wznów lokalnych (11 przypadków) oraz przerzutów – 1 przypadek (przerzut do mózgu). W tej grupie wyłącznie jeden pa-

cient był obciążony polimorfizmem Arg554Lys. Wyniki rozkładu polimorfizmu Arg554Lys w obrębie grupy badanej zebrano w tabeli 1. Obecność polimorfizmu każdorazowo potwierdzano prowadząc sekwencjonowanie produktów PCR (rycina 2).

Dyskusja

Indywidualne zróżnicowanie podatności na rozwój nowotworu jest dobrze udokumentowane. Genetyczne uwarunkowanie procesu kancerogenezy może być wynikiem nie tylko prostego dziedziczenia genu warunkującego chorobę, ale także jest pochodną wrodzonego, osobniczego zróżnicowania szlaków metabolicznych i modulowania odpowiedzi na egzogenne czynniki kancerogenne. Rola genotypu w kształtowaniu odpowiedzi na czynniki rakotwórcze odgrywa dużą rolę w przypadku nowotworów tytoniozależnych, do których należą raki płaskonabłonkowe regionu głowy i szyi. Szczególne znaczenie czynniki genetycznemu należy przypisać w przypadku wystąpienia kolejnego, niezależnego ogniska nowotworowego.

Palenie tytoniu jest przyczyną ponad 95% raków płaskonabłonkowych krtani oraz nieco niższego odsetka raków jamy ustnej i gardła; niemniej u zaledwie około 5% palaczy dochodzi do rozwoju raków głowy i szyi a z kolei, u co ósmego z chorych potencjalnie może rozwinąć się drugi nowotwór pierwotny. Jednocześnie przebieg choroby jest nieprzewidywalny i niezależny od intensywności ekspozycji na czynniki ryzyka (tytoń, alkohol) i dlatego warto dociekać mechanizmów molekularnych rządzących procesami inicjacji i rozwoju stanów nowotworowych. Kluczem, który pozwoliłby na określenie indywidualnego ryzyka wystąpienia nowego ogniska wydaje się poszukiwanie podłoża genetycznego rozwoju mnogich nowotworów głowy i szyi.

Geny kodujące enzymy I i II fazy metabolizmu kancerogenów oraz geny kodujące enzymy naprawy DNA cechuje polimorfizm, który może warunkować indywidualną wydolność metaboliczną oraz zdolność naprawczą i tym samym podatność na rozwój grupy nowotworów indukowanych czynnikami egzogennymi [6,23]. Liczne doniesienia literaturowe typują geny kształtujące indywidualną podatność na rozwój choroby nowotworowej, omawiają powiązania polimorfizmów poszczególnych genów z ryzykiem rozwoju nowotworu i podejmują próby definiowania genotypów ryzyka dla raków płaskonabłonkowych głowy i szyi [12,14,16,19,26,27]. Najszerzej przebadano do tej pory szereg enzymów zaangażowanych zarówno w aktywację i detoksykację kancerogenów jak i naprawę wyidukowanych przez nie uszkodzeń. Wśród nich znalazły się: enzymy cytochromu P-450 kodowane przez geny CYP1A1 i CYP2E1 [18], transferazy S-glutaminowe będące jedną z najważniejszych grup enzymów II fazy metabolizmu kancerogenów zawartych w dymie tytoniowym. W następnej kolejności badano polimorfizmy enzymu N-acetylotransferazy2 (NAT2) odpowiedzialnego za detoksykację amin aromatycznych i katalizującego zarówno etap aktywacji (O-acetylacja) jak i detoksykacji (N-acetylacji) [15]; białko XPD

– ewolucyjnie zakonserwowaną helikazę, zaangażowaną w naprawę typu NER oraz działającą jako podjednostka czynnika transkrypcyjnego TFIIH [8]. Przebadano także polimorfizmy w obrębie genów XRCC3, XRCC1 odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń w częścach DNA [10,11]. Na tym tle analiza rozkładu polimorfizmów w obrębie genu dla receptora Ah, będącego czynnikiem transkrypcyjnym indukującym grupę enzymów zaangażowanych w procesy detoksykacji i aktywacji kancerogenów, wpisuje się uzupełniająco w trend badań nad podatnością na szkodliwe efekty ekspozycji na dym tytoniowy.

Niemniej ważne od samych badań laboratoryjnych obejmujących genotypowanie w obrębie receptora Ah było ustalenie, czy pacjent, nadal żyje, a jeśli nie to, kiedy zmarł i jaka była przyczyna śmierci. Alternatywnie ustalano parametr przeżycia pacjentów. W zależności od lokalizacji i rodzaju guza za bezpieczną granicę czasową umożliwiającą uzyskanie stanu wyleczenia w przebiegu choroby nowotworowej uznaje się przeżycie przekraczające okres od 4 do 7 lat od postawienia diagnozy. Czas ten związany jest z charakterystyką samego nowotworu jak i rozwoju zarówno wznów lokalnych, odległych przerzutów a także rozwojem drugich pierwotnych nowotworów w obrębie zajmowanych regionów. Nawroty choroby nowotworowej są ważnym problemem klinicznym. Jak wykazują badania odsetek drugich nowotworów (wznów, drugich nowotworów pierwotnych, przerzutów) jest wyższy niżby to wynikało z ogólnej statystyki zapadalności w danym przedziale wiekowym [21]. Jak akcentują wyniki wieloletnich analiz w regionie głowy i szyi ponad połowa drugich nowotworów ujawnia się przed upływem trzech lat. Jones i wsp. [17] w przebadanej grupie 274 chorych stwierdzili, że średni czas do ujawnienia się drugiego nowotworu wynosił 36 miesięcy, zaś Panosetti [22] w grupie 855 określił go na 45 miesięcy, w tym ponad 50% zmian pojawia się w ciągu 31 miesięcy. Z analiz tych wynika, że czas dłuższy niż 5 lat jest bardziej typowy dla innych lokalizacji niż region głowy i szyi. Zasadne jest zatem stosowanie protokołu 5-letniego ścisłego monitorowania, ponieważ połowa guzów metachronicznych pojawia się przed upływem 5 lat [9]. Okres ten powinien obejmować rygorystyczne monitorowanie chorych na przestrzeni czasu od samego rozpoznania choroby.

Z całą pewnością sprawdzona w eksperymencie metodyka pozostaje do wykorzystania w kontekście poszerzenia grupy badanej. Jedyłą trudność stanowiła kwestia pozyskania informacji na temat przeżycia pacjentów oraz czas potrzebny do zaklasyfikowania prób do grupy z przeżyciem nie niższym niż 5 lat. Badania prowadzone są dalej.

Wnioski

Uzyskane w eksperymencie wstępne wyniki analiz nie wskazują na oczekiwaną korelację polimorfizmu Arg554Lys w genie AHR z przeżywalnością pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem krtani w kontekście ekspozycji na dym tytoniowy. Objęta badaniem grupa pacjentów z pewnością wymaga poszerzenia. Jednocześnie udało się odnotować obecność nowego, nieopisywanego wcześniej w literaturze, polimorfizmu 1468 A>G, co wskazuje na zasadność prowadzonych przez nas badań. Z wyjątkiem inspirującej nas do podjęcia tego zagadnienia publikacji [1], nie próbowano dotąd korelować wariantów receptora Ah z długością przeżycia osób chorych na nowotwór. Nasze badania były więc pierwszą próbą weryfikacji uzyskanych przez Berwick i wsp. [1] wyników, przeprowadzoną na innym materiale biologicznym.

Piśmiennictwo

- Berwick M., Matullo G., Song Y.S. et al.: Association between aryl hydrocarbon receptor genotype and survival in soft tissue sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 3997.
- Brauzed., Januchowski R., Szyfter K.: Differences between rats and mice in induction of 4Sβ-naphthoflavone-binding protein expression by treatment with β-naphthoflavone. *J. Appl. Genet.* 2002, 43, 371.
- Brauzed., Malejka-Giganti D.: A novel 4S [3H] β-naphthoflavone-binding protein in liver cytosol of female Sprague-Dawley rats treated with aryl hydrocarbon receptor agonists. *Biochem. J.* 2000, 347, 787.
- Brauzed., Wielgosz S.M., Pawlak A.L., Baer-Dubowska W.: Effect of the route of benzo[a]pyrene administration on sister chromatid exchange and DNA binding in bone marrow of mice differing with respect to cytochrome P450 1A1 induction. *Toxicol. Lett.* 1997, 91, 211.
- Brauzed., Mikstacka R., Baer-Dobowska W.: Formation and persistence of benzo[a]pyrene-DNA adducts in different tissues of C57BL/10 and DBA/2 mice. *Carcinogenesis* 1991, 12, 1607.
- Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. et al.: Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol. Lett.* 1998; 102-103, 173.
- Burbach K. M., Poland A., Bradfield C.A.: Cloning of the receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Acad. Sci. USA.* 1992, 89, 8185.
- Coin F., Rodolfo C.: Mutation in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nature Genet.* 1998; 20, 184.
- Di Martino E., Hausman R.: Survival in patients with second primary malignancies of patients with head and neck cancer. *J. Laryngol. Otol.* 2002, 116, 832.
- Ding R.: Depletion of nuclear poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression: influences of genomic stability, chromatid organization and carcinogen cytotoxicity. *Cancer Res.* 199, 54, 4627.
- Eisen J.A.: A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins and processes. *Mutat. Res.* 1999, 435, 171.
- Geisler S.A., Olshan A.F.: GSTM1, GSTT1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGe review. *Am. J. Epidemiol.* 2001, 154, 95.
- Harper P.A., Wong J.Y., Lam M.S., Okey A.B.: Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem. Biol. Interact.* 2002, 141, 161.
- Hasiebe M., Brennan P., Strange R.C. et al.: Meta-analysis of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003, 12, 1509.
- Hein D.W., Rustan T.D.: Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 1993, 14, 1633.
- Jahnke V., Matthias C., Bockmuhl U., Strange R.C.: Genetic predisposition for the development of head and neck carcinomas. *Laryngorhinotologie* 1999, 78, 24.
- Jones A.S., Philips D.E.: Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995, 75, 1343.
- Koop D.R.: Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 1E1. *FASEB J.* 1992, 6, 724.
- Lazarus P., Park J.Y.: Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2000, 36, 421.
- Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzales F.J.: Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 23847.
- Odgen G.A.: Second malignant tumors in head and neck. *Cancer Br. Med. J.* 1991, 302, 193.
- Panosetti A., Mamelle G.: Multiple synchronous and metachronous cancers of the upper aerodigestive tract: a nine year study. *Laryngoscope* 1989, 99, 1267.
- Pavanello S., Clonfero E.: Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.* 2000, 463, 285.
- Poland A., Glover E.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol. Pharmacol.* 1980, 17, 86.
- Safe S.H.: Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 247.
- Seker H., Butkiewicz D., Bowman E.D. et al.: Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res.* 2001, 61, 7430.
- Shen H., Strugis E.M., Dahlstrom K.R. et al.: A variant of the DNA repair gene XRCC3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int. J. Cancer.* 2002, 99, 869.
- Shmizu Y., Nakatsuru Y., Ichinose M. et al.: Benzo(a)pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 779.
- Wielgosz S.M., Brauzed., Pawlak A.L.: Ah locus-associated differences in induction of sister-chromatid exchange and in DNA adducts by benzo(a)pyrene in mice. *Mutat. Res.* 1991, 246, 129.
- Wong J.M.Y., Harper P.A., Meyer U.A. et al.: Ethnic variability in the allelic distribution of human aryl hydrocarbon receptor codon 554 and assessment of variant receptor function in vitro. *Pharmacogenetics* 2001, 11, 85.
- Vineis P., Alavanja M., Buffler P. et al.: Tobacco and cancer: Recent epidemiological evidence. *J. Nat. Cancer Inst.* 2004, 96, 99.