

## RIPARAZIONE DEL DANNO AL DNA: DAI MECCANISMI ALLE IMPLICAZIONI CLINICHE

Valeria Simonelli (a), Maria Rosaria D'Errico (a), Paola Fortini (a), Eleonora Parlanti (a), Cecilia Guastadisegni (a), Angelo Salvatore Calcagnile (a), Barbara Pascucci (a)(b), Filomena Mazzei (a), Eugenia Dogliotti (a)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Istituto di Cristallografia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

### Introduzione

I radicali liberi dell'ossigeno (*Radical Oxygen Species*, ROS) sono delle specie ossidanti altamente reattive prodotte sia dal metabolismo aerobico della cellula che da diversi agenti ambientali quali le radiazioni ionizzanti, i farmaci chemioterapici e i metalli. Una delle conseguenze della produzione di ROS è il danno al DNA che include l'induzione di danno alle basi e agli zuccheri, le rotture della catena fosfodiesterica e i legami crociati (*cross-links*) tra DNA e proteine. Queste lesioni possono portare ad instabilità genetica. Ci sono pochi esempi di una relazione causale tra stress ossidativo e sviluppo e/o progressione di malattia (es. l'abetalipoproteinemia, il morbo di Wilson e la talassemia). Per la maggior parte delle patologie infiammatorie croniche, le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, il cancro e il processo d'invecchiamento il ruolo causale dello stress ossidativo nella patogenesi e/o progressione della malattia/processo non è stato chiaramente dimostrato, nonostante molte evidenze sperimentali indichino livelli aumentati di danno ossidativo sia sul DNA che sulle proteine.

Il primo livello di difesa cellulare contro i danni da ROS è il sistema antiossidante. Una volta che i ROS raggiungono il nucleo, una rete complessa di sistemi di riparazione del DNA, di controllo del ciclo cellulare e della morte intervengono come ulteriore protezione. La riparazione del DNA è in grado di contrastare efficientemente la mutagenesi, la citostasi e la citotossicità indotte dal danno ossidativo. Nel nucleo, il danno ossidativo al DNA è riparato preferenzialmente mediante il sistema per escissione di base (*base excision repair*, BER). In particolare, una delle due vie del BER, il *long-patch* BER (LP-BER), caratterizzata a livello molecolare nel nostro laboratorio (1), ha un ruolo importante nel processamento del danno ossidativo (2, 3). Altri sistemi di riparazione quali la via di riparazione per escissione di nucleotidi (*nucleotide excision repair*, NER) e la via di riparazione degli appaiamenti errati (*mismatch repair*, MMR), partecipano al controllo dei livelli di ossidazione del DNA. Il nostro laboratorio ha contribuito all'identificazione del ruolo nella riparazione del danno ossidativo di alcune proteine del NER, in particolare le proteine *Xeroderma pigmentosum C* (XP-C) e *Cockayne Syndrome* (CS), e ne ha chiarito i meccanismi d'azione (4, 5). I mitocondri, che sono la maggiore sorgente di ROS e anche il loro principale bersaglio, presentano un efficiente sistema di riparazione BER (*short-* e LP-BER) ma non presentano il NER attivo (6).

Ad oggi siamo a conoscenza di una sola malattia genetica causata da mutazioni nei geni del BER: la poliposi adenomatosa associata all'omologo del gene *mutY* di *E. coli* (*MUTYH*). Mutazioni germinali nel gene che codifica per questa DNA glicosilasi coinvolta nella riparazione del danno ossidativo sono associate con aumentato rischio di cancro del colon (7). Il contributo dell'accumulo di danno ossidativo in pazienti affetti da XP-C o CS

allo sviluppo delle loro caratteristiche cliniche è ancora un campo d'indagine aperto. Il danno ossidativo potrebbe contribuire alla estrema suscettibilità al cancro della pelle tipico dei pazienti XP-C e alla neurodegenerazione osservata nei pazienti affetti da CS. È probabile che mutazioni in altri geni della risposta al danno ossidativo siano contro-selezionati, poiché la funzionalità di questo complesso network di meccanismi di controllo è richiesto per la protezione dal danno endogeno.

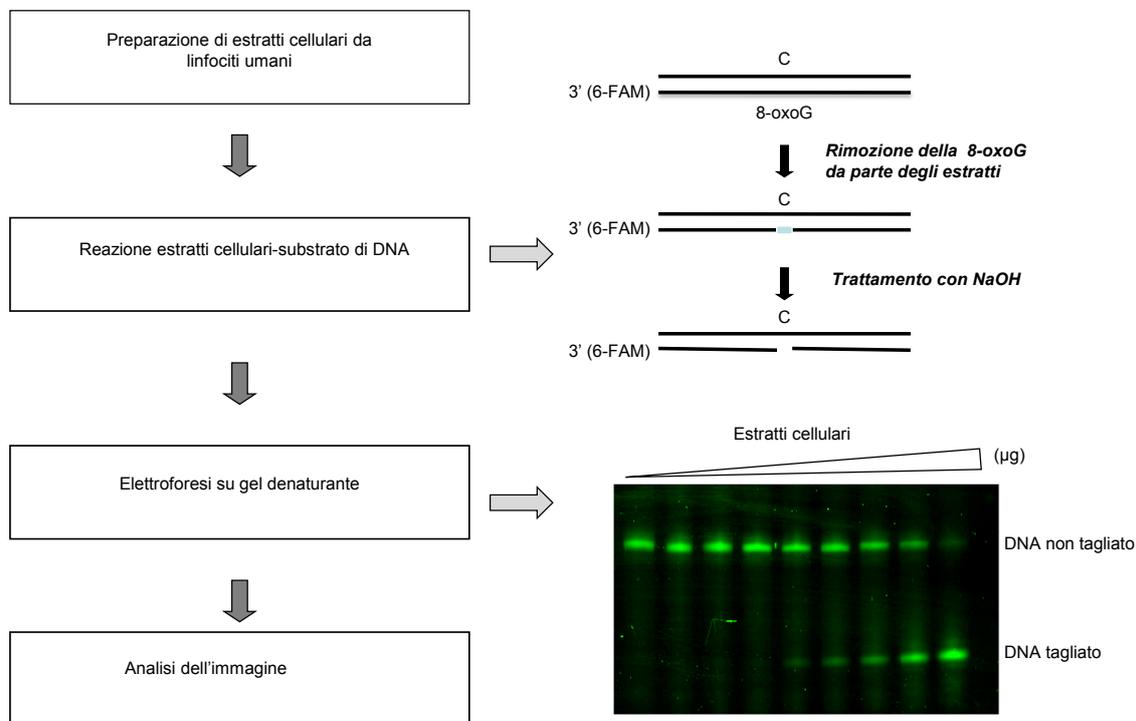
## **Il ruolo di polimorfismi in geni della riparazione del danno ossidativo al DNA nel cancro sporadico**

Se il danno ossidativo giochi o no un ruolo nell'insorgenza del cancro sporadico è ancora una domanda aperta. A differenza del cancro ereditario, che è associato con mutazioni in pochi geni ad alta penetranza, il cancro sporadico è principalmente associato con una combinazione di varianti ad alto rischio in geni con penetranza bassa o media. Polimorfismi (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) in geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo sono stati ampiamente esplorati in studi di popolazione, soprattutto in relazione al rischio di cancro ma i risultati sono stati spesso inconsistenti. In molti studi il numero di geni e SNP analizzati è piccolo (a volte vengono caratterizzate varianti polimorfiche di un solo gene) e questo costituisce una seria limitazione soprattutto in considerazione del coinvolgimento nel cancro e, più in generale, nelle malattie complesse di difetti multigenici. Un altro problema risiede nella frequente assenza di informazioni sulla funzionalità delle varianti polimorfiche studiate. Entrambe le problematiche sono state affrontate nel nostro laboratorio sia disegnando uno studio che considera SNP in numerosi geni coinvolti nella risposta al danno ossidativo in campioni di cancro gastrico, sia sviluppando saggi funzionali per enzimi della riparazione del danno ossidativo utilizzabili in studi di popolazione.

Il cancro gastrico è una delle forme di cancro più frequenti e tra le maggiori cause di morte per tumore. Uno dei principali fattori di rischio coinvolti nella sua eziologia è l'infezione da *Helicobacter pylori*, che attraverso l'innescò di processi infiammatori induce danno ossidativo nella mucosa gastrica. Questa patologia è stata, perciò, definita una *oxyradical overload disease*. In collaborazione con il laboratorio di Epidemiologia Molecolare dell'ISPO di Firenze diretto dal dott. Palli, abbiamo condotto un'analisi di SNP in un ampio pannello di geni coinvolti nella risposta al danno ossidativo, in particolare geni del metabolismo ossidativo (GSTM1, GSTT1), della riparazione del DNA (APE1, XRCC1, OGG1, XPC, XPA, ERCC1, XPD, XRCC3, MGMT) e della risposta immunitaria (IL-1B, IL-1RN) in pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico e nei loro rispettivi controlli. Quest'analisi ha mostrato come la presenza di SNP in geni appartenenti a diversi processi cellulari concorra al rischio di cancro gastrico (8, 9, 10).

Solo la conoscenza della relazione struttura-funzione permette però di validare l'uso di SNP come biomarcatori di suscettibilità. La grande sfida per il futuro rimane proprio lo sviluppo di saggi funzionali utilizzabili per la validazione necessaria per stabilire il contributo di varianti polimorfiche alla modulazione del rischio di malattia. Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un saggio funzionale per rilevare l'attività di una delle proteine chiave nella riparazione del danno ossidativo al DNA, in particolare dell'8-oxoguanina (8-oxoG). Questo saggio, che è basato sulla valutazione della capacità di rimozione di questa base ossidata mutagena da parte di estratti proteici preparati da linfociti umani (Figura 1), è stato validato (11) e applicato con successo in uno studio di popolazione per caratterizzare l'effetto di specifiche varianti polimorfiche sulla capacità di riparazione

del danno ossidativo. Brevemente, un oligonucleotide a doppio filamento marcato con un colorante fluorescente (6-FAM) e contenente un singolo residuo di 8-oxoG viene incubato con estratti cellulari e la capacità di rimozione della base ossidata viene misurata come quantità di DNA tagliato risolto su gel di poliaccrilamide denaturante e quantificato con analisi dell'immagine.



**Figura 1. Schema del saggio per la valutazione della capacità di riparazione della base ossidata 8-oxoguanina (8-oxoG) da parte di estratti di linfociti umani**

In particolare, una popolazione di soggetti sani è stata caratterizzata per la presenza di varianti polimorfiche dell'8-oxoG DNA glicosilasi, OGG1, e l'attività di riparazione dell'8-oxoG è stata misurata, utilizzando il saggio appena descritto, in linfociti di sangue periferico.

Una diminuzione statisticamente significativa della capacità di riparazione è stata rilevata esclusivamente nei soggetti omozigoti per il polimorfismo Ser326Cys di OGG1. Questa variante è stato poi prodotta *in vitro* e le sue caratteristiche biochimiche e strutturali sono state analizzate con saggi funzionali e tecniche di spettrometria di massa. Abbiamo così stabilito che esiste una forte associazione tra la presenza della cisteina in posizione 326 e la sensibilità all'ossidazione della proteina stessa. Questi dati forniscono una possibile lettura meccanicistica della diminuita capacità di riparazione dei soggetti omozigoti per questa variante. È importante ricordare che studi epidemiologici indicano un'associazione tra la presenza di questa variante e un aumentato rischio di tumori associati al fumo di sigaretta (12).

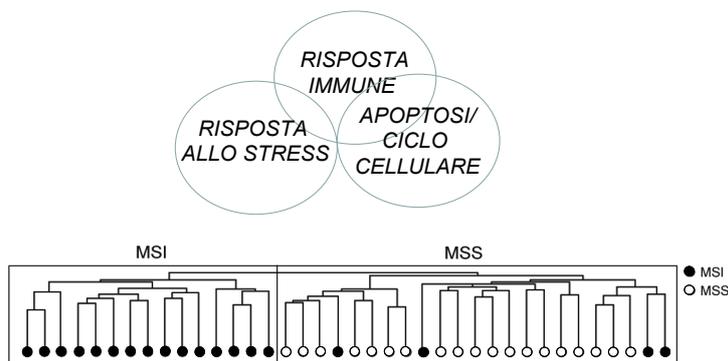
## Il ruolo di alterazioni dei geni della riparazione del danno ossidativo al DNA nel cancro sporadico

Per identificare il potenziale ruolo di alterazioni (mutazioni e/o cambiamenti nei livelli di trascrizione) di geni della riparazione nell'insorgenza del cancro gastrico sono stati seguiti due approcci. Il primo si è basato sull'analisi di tessuti di tumore gastrico per identificare mutazioni nei geni del BER, in particolare della DNA polimerasi  $\beta$  (Pol  $\beta$ ); il secondo ha sfruttato l'uso della trascrittomica per determinare e confrontare il profilo d'espressione genica di tumori gastrici con o senza instabilità dei microsatelliti (caratteristica associata con difetti nel MMR). Quest'ultimo approccio è stato utilizzato anche per confrontare i profili d'espressione genica di tessuti intestinali sani e cronicamente infiammati, ottenuti da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa. A differenza dei tumori sporadici del colon e dello stomaco, tumori intestinali su base infiammatoria presentano un fenotipo instabile completamente indipendente dalla deregolazione del MMR. La trasferibilità dei profili di espressione dei geni della riparazione del DNA alla pratica clinica nel disegno delle strategie oncologiche chemioterapiche è un obiettivo importante di quest'ultimo approccio.

Le mutazioni di Pol  $\beta$ , la più importante DNA polimerasi del BER, sono state descritte in diversi tipi di tumore quali quelli del colon, della prostata, della vescica e dello stomaco ed è stato dimostrato che alcune di queste mutazioni causano un fenotipo mutatore. Nel caso del cancro gastrico, è stata descritta un'alta frequenza di mutazioni di Pol  $\beta$  (in circa il 30% dei tumori analizzati) in pazienti provenienti dalla Cina o dal Giappone (13). Abbiamo pertanto condotto un'analisi delle mutazioni in questo gene in una serie di tessuti gastrici tumorali e normali prelevati dallo stesso soggetto, appartenenti ad una casistica italiana. In questi campioni non abbiamo identificato mutazioni di Pol  $\beta$  associate al tumore ma abbiamo osservato un'elevata frequenza di varianti dello *splicing* (14). Queste varianti non sono tumore-specifiche, dal momento che sono state rilevate con eguale frequenza nei tessuti normali e tumorali gastrici così come in altri tipi di tessuti sani e in linee gastriche tumorali. L'alta variabilità inter-individuale dei livelli d'espressione di Pol  $\beta$  e delle sue varianti indica la complessità degli eventi che regolano l'espressione di questo gene chiave nel controllo della stabilità del genoma. La variante di *splicing* di Pol  $\beta$  riscontrata più frequentemente nei tessuti analizzati, caratterizzata dalla delezione dell'esone 2 (Ex2 $\Delta$ ), è stata analizzata in dettaglio. Abbiamo chiaramente dimostrato che questa variante non codifica per alcuna proteina ed è quindi un RNA non codificante (*non-coding RNA*, ncRNA). Un'altra caratteristica interessante di questo ncRNA è la sua poliadenilazione e un'emivita che supera quella del mRNA *wild-type*. Inoltre è stato osservato che l'mRNA variante è localizzato ai siti attivi di traduzione (i poliribosomi), come il trascritto *wild-type*. Questi dati suggeriscono che questo ncRNA, producendo delle isoforme non funzionali, abbia un ruolo regolatorio dei livelli di Pol  $\beta$ , che sono critici per la stabilità del genoma, o che moduli l'espressione di mRNA specifici coinvolti nella risposta allo stress.

Il 10-25% dei tumori gastrici presenta difetti nel MMR. Il profilo di espressione genica di tumori dell'endometrio e del colon con e senza MSI suggerisce che diversi meccanismi di segnalazione aberrante sottendono la genesi di questi tumori. Analogamente, la nostra analisi dei profili d'espressione genica (*Affimetrix platform*) dei tumori gastrici ha mostrato chiaramente che variazioni nei geni della risposta allo stress, immunitaria e apoptotica permettono di discriminare tra tumori con e senza MSI (15). Nella Figura 2 sono indicati i *pathway* genici che differenziano i tumori con MSI da quelli stabili (microsatellite stable=MSS). I dati di espressione genica sottoposti all'analisi dei *cluster unsupervised* distinguono

chiaramente i tumori con MSI (cerchio nero) da quelli stabili (cerchio bianco) (modificato da D'Errico, 2009).

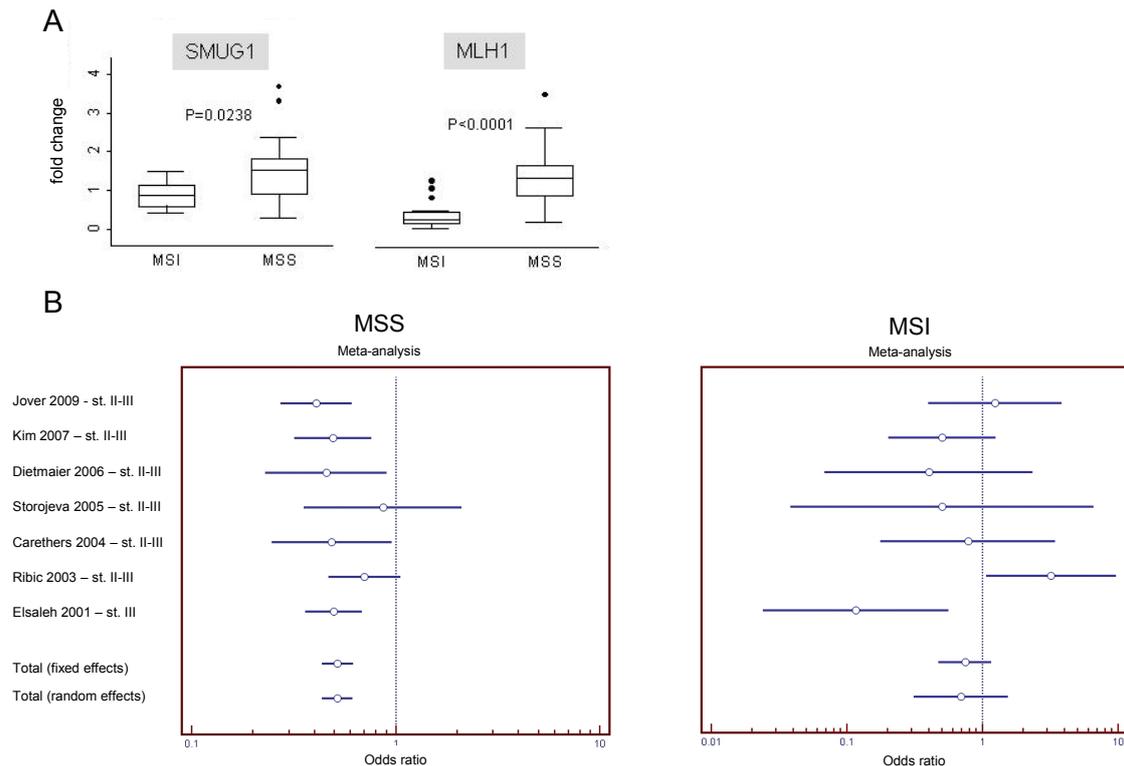


**Figura 2. Analisi dei profili d'espressione genica di tumori gastrici con e senza MSI**

Come nel caso del tumore del colon, i tumori gastrici con MSI presentano un meccanismo di sorveglianza immunitaria stringente associato ad una risposta p53 funzionale. Queste caratteristiche sono consistenti con la prognosi favorevole di questi tumori.

L'espressione dei geni della riparazione di tumori con e senza MSI misurata con RT-PCR ha permesso di evidenziare che la maggior parte dei tumori con MSI presentava inattivazione dell'omologo del gene MutL di *E. coli* (MLH1) del MMR (Figura 3A) e che diversi geni della riparazione erano espressi in modo differenziale nei due tipi di tumore. I livelli di espressione di MLH1 erano fortemente associati con l'espressione di geni noti per essere un bersaglio del fenotipo mutatore, quali la DNA glicosilasi specifica per G/T e G/U mismatches, MBD4, e la proteina della ricombinazione MRE11. Anche in questo caso, la modulazione di questi geni discriminava i tumori gastrici sulla base del fenotipo MSI.

La diminuita espressione della uracile-DNA glicosilasi SMUG1 era anche una caratteristica tipica di questi tumori (Figura 3A). Questa osservazione può essere rilevante nell'ottica del disegno della chemioterapia per questo tipo di tumore. Infatti, è stato recentemente scoperto che, oltre al MMR, anche varie DNA glicosilasi del BER, inclusa SMUG1, giocano un ruolo importante nella riparazione del danno indotto dal 5-Fluorouracile (5-FU), uno dei farmaci più utilizzati per il trattamento del cancro sporadico sia del colon che dello stomaco. Diversi studi indicano che l'uso di questo farmaco è inefficace nel caso dei tumori con MSI. La citotossicità indotta dal 5-FU sembra essere dovuta all'intervento sia del MMR che del BER, che portano alla formazione di rotture del DNA citotossiche (16). Di conseguenza, l'assenza del MMR e la ridotta efficienza del BER, causata dalla diminuita espressione di SMUG1, osservata nei tumori con MSI, porterebbe alla resistenza all'azione citotossica del 5-FU. A questo riguardo abbiamo condotto una meta-analisi di studi clinici che valutano la sopravvivenza e la risposta alla terapia con 5-FU di pazienti affetti da cancro del colon in base alla presenza di MSI (17). Come mostrato in Figura 3B, la terapia con 5-FU è efficace solo nel caso dei tumori senza MSI (OR=0,52 95% CI 0,4-0,6 p<0.0001) con assenza di eterogeneità (p=0,53 I(2)=0%) ma non in quelli che presentano instabilità genetica che mostrano una risposta eterogenea alla terapia (OR=0,69 95%CI 0,3-1,5 p=0,1 eterogeneità: p=0,03 I(2)=58%). Noi proponiamo che questo risultato sia dovuto al fatto che l'uso di un solo marcatore (cioè MSI) nel disegno delle terapie non è sufficiente a descrivere la complessità dei meccanismi che sottendono la citotossicità da 5-FU. Per dettagli sugli studi analizzati vedi Guastadisegni *et al.*, 2010.



**Figura 3. A. Analisi con RT-PCR dei livelli di espressione di geni della riparazione del DNA nei tumori con MSI confrontati con quelli senza MSI. B. Meta-analisi di studi che valutano la sopravvivenza di pazienti affetti da cancro colorettales, caratterizzati per MSI, in funzione della terapia con 5-FU**

L'esame dell'espressione dei geni della riparazione ci ha anche permesso di identificare una correlazione inversa tra l'espressione di MLH1 (correlazione negativa) e di Pol  $\beta$  (correlazione positiva) (Simonelli, dati non pubblicati). Studi precedenti hanno mostrato interazioni compensatorie tra meccanismi di riparazione nelle cellule tumorali. L'esempio piú significativo è l'attivazione della proteina del BER PARP1 in assenza delle proteine della ricombinazione omologa BRCA1/2 (18). L'up-regolazione di Pol  $\beta$  nei tumori gastrici con MSI potrebbe rappresentare un meccanismo d'interazione compensatoria tra BER e MMR. Per testare questa ipotesi abbiamo costruito linee di tumore gastrico che over-esprimono Pol  $\beta$ , con e senza l'inattivazione del MMR. In questo sistema testeremo la possibilità che questi due meccanismi di riparazione causino un fenomeno di letalità sintetica (la combinazione dei due difetti è letale) utilizzando inibitori specifici di Pol  $\beta$ . Inoltre, verificheremo la risposta ai trattamenti chemioterapici nelle linee da noi ingegnerizzate.

Le malattie infiammatorie intestinali (*inflammatory bowel disease*, IBD), che includono la rettocolite ulcerosa, sono disordini cronici caratterizzati da continue fasi di remissione e recrudescenza. Pazienti affetti da IBD mostrano un aumentato rischio di sviluppare il cancro del colon. Abbiamo analizzato biopsie fresche di tessuto intestinale, sia sano che infiammato, raccolte da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa di età pediatrica durante le colonscopie di sorveglianza. L'instabilità dei micro satelliti è stata osservata nel 44% dei casi e la sua indipendenza da alterazioni del MMR è stata confermata (Fortini, dati non pubblicati). È stato

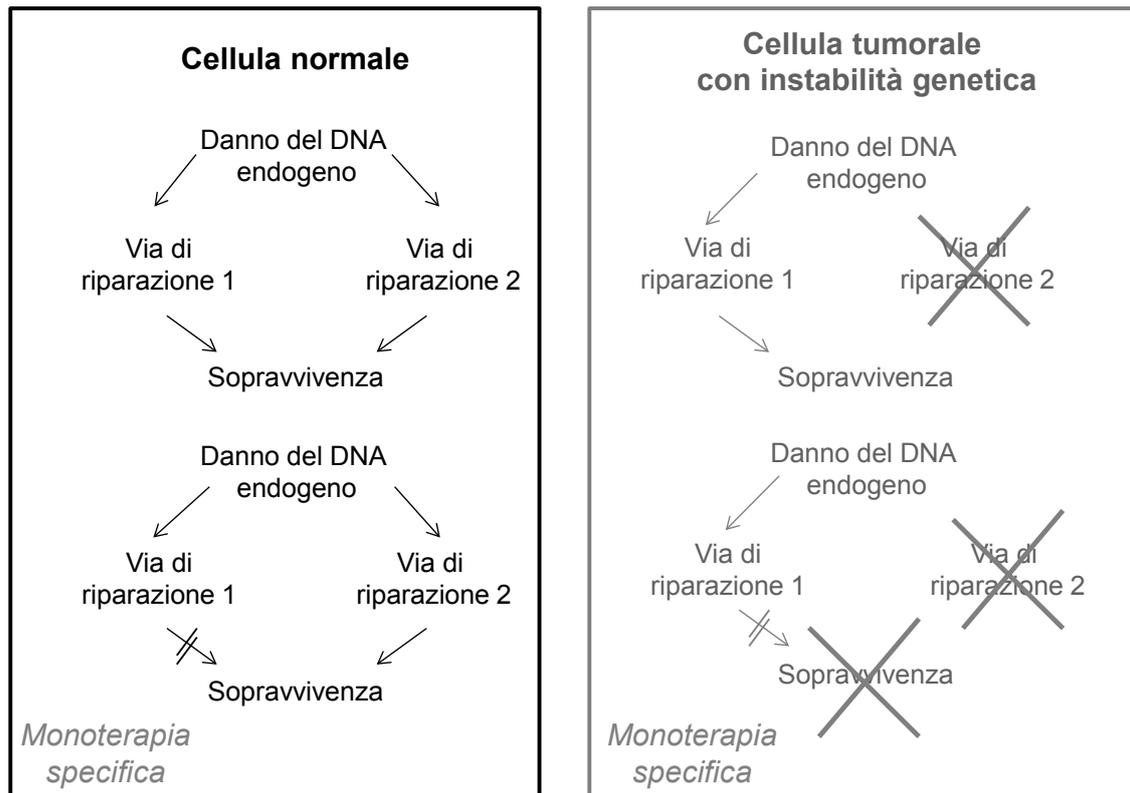
ipotizzato che la MSI possa essere causata da alterazioni del BER (19) e che l'over-espressione di alcuni enzimi del BER, osservata in biopsie di pazienti IBD, potrebbe rappresentare una sorta di risposta adattativa allo stress ossidativo caratteristico del tessuto infiammato. Il potenziale contributo di disfunzioni del BER al fenotipo instabile associato alle IBD è attualmente oggetto di studio nel nostro laboratorio. I livelli di ossidazione nel tessuto infiammato sono stati misurati usando come marcatore l'8-oxoG. I dati sinora raccolti indicano un aumento dei livelli di 8-oxoG e dei livelli d'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria nel tessuto infiammato rispetto alla controparte sana, suggerendo che i livelli di 8-oxoG possano essere utilizzati come marcatori dell'infiammazione. Per l'identificazione di marcatori prognostici predittivi della risposta alla terapia e del rischio di sviluppare una neoplasia sono attualmente in corso studi di associazione tra caratteristiche cliniche e molecolari dei pazienti IBD.

## Prospettive future

Gi studi in corso nel nostro Reparto presentano come caratteristica comune una forte integrazione tra la ricerca applicata (studi di epidemiologia molecolare) e ricerca di base che affronta con sistemi modello *in vitro* la domanda di quali siano i meccanismi alla base dei fenomeni che osserviamo nella popolazione. Per quanto riguarda gli SNP riteniamo che lo studio della loro attività funzionale debba essere affrontato prima di avviare studi di screening, dal momento che solamente gli SNP con conseguenze funzionali possono contribuire allo sviluppo/progressione della malattia. Di conseguenza, nel nostro laboratorio intendiamo sviluppare nuove tecniche per *high-throughput screening* dell'attività funzionale degli enzimi della riparazione. Inoltre, lo studio delle funzioni regolative di SNP non codificanti rappresenta un campo di ricerca futura.

L'informazione sui profili di espressione dei geni della riparazione deve essere considerata e usata per disegnare terapie chemioterapiche *tailored*. L'attività degli agenti chemioterapici è limitata dall'efficienza dei sistemi di riparazione che giocano un ruolo chiave nel determinare la resistenza cellulare intrinseca o acquisita al trattamento con radiazioni o agenti chemioterapici. Sulla base di queste considerazioni, le terapie anti-cancro emergenti hanno come bersaglio i sistemi di riparazione del DNA. Lo sviluppo di inibitori della riparazione si è inizialmente focalizzato sul loro uso come potenziatori dell'attività citotossica. Tuttavia questo approccio può essere esteso ad inibire specifiche vie di riparazione che sono attive, come meccanismo compensatorio, in tumori difettivi per una via di riparazione (Figura 4). La monoterapia viene disegnata specificamente per inibire il meccanismo di riparazione compensatorio (via di riparazione 1) che si è attivato nelle cellule tumorali in seguito al difetto in un'altra via di riparazione (via di riparazione 2) e quindi uccidere selettivamente le cellule tumorali con instabilità genetica.

L'applicazione di grande successo di questo approccio è l'uso di inibitori di PARP-1 che mostrano un chiaro effetto benefico per il carcinoma mammario ma solo nei portatori di mutazioni nei geni BRCA1/2. La caratterizzazione dei meccanismi di riparazione compensatori che spesso si attivano in cellule tumorali e lo sviluppo di *small molecules* (composti organici a basso peso molecolare che si legano con alta affinità a biopolimeri) come che inibiscano enzimi chiave del BER costituiscono un obiettivo importante della nostra attività di ricerca.



**Figura 4. Schema dell'applicazione del concetto di letalità sintetica per il disegno di terapie anti-tumorali specifiche**

## Bibliografia

1. Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two *pathways* for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1996;271(16):9573-8.
2. Fortini P, Pascucci B, Belisario F, Dogliotti E. DNA polymerase beta is required for efficient DNA strand break repair induced by methyl methanesulfonate but not by hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res* 2000;28(16):3040-6.
3. Parlanti E, Fortini P, Macpherson P, Laval J, Dogliotti E. Base excision repair of adenine/8-oxoguanine mispairs by an aphidicolin-sensitive DNA polymerase in human cell extracts. *Oncogene* 2002;21(34):5204-12.
4. D'Errico M, Parlanti E, Teson M, de Jesus BM, Degan P, Calcagnile A, Jaruga P, Bjørås M, Crescenzi M, Pedrini AM, Egly JM, Zambruno G, Stefanini M, Dizdaroglu M, Dogliotti E. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J* 2006;25(18):4305-15.
5. D'Errico M, Parlanti E, Teson M, Degan P, Lemma T, Calcagnile A, Iavarone I, Jaruga P, Ropolo M, Pedrini AM, Orioli D, Frosina G, Zambruno G, Dizdaroglu M, Stefanini M, Dogliotti E. The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells. *Oncogene* 2007;26:4336-43.

6. Liu P and Demple B. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environ Mol Mutagen* 2010;51(5):417-26.
7. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(21):1631-4.
8. Palli D, Polidoro S, D'Errico M, Saieva C, Guarrera S, Calcagnile AS, Sera F, Allione A, Gemma S, Zanna I, Filomena A, Testai E, Caini S, Moretti R, Gomez-Miguel MJ, Nesi G, Luzzi I, Ottini L, Masala G, Matullo G, Dogliotti E. Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer. *Mutagenesis* 2010;(6):569-75.
9. Palli D, Saieva C, Gemma S, Masala G, Gomez-Miguel MJ, Luzzi I, D'Errico M, Matullo G, Ozzola G, Manetti R, Nesi G, Sera F, Zanna I, Dogliotti E, Testai E. GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk Italian population. *Int J Cancer* 2005;115(2):284-9.
10. Palli D, Saieva C, Luzzi I, Masala G, Topa S, Sera F, Gemma S, Zanna I, D'Errico M, Zini E, Guidotti S, Valeri A, Fabbrucci P, Moretti R, Testai E, del Giudice G, Ottini L, Matullo G, Dogliotti E, Gomez-Miguel MJ. Interleukin-1 gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol* 2005;100(9):1941-8.
11. Mazzei F, Guarrera S, Allione A, Simonelli V, Narciso L, Barone F, Minoprio A, Ricceri F, Funaro A, D'Errico M, Vogel U, Matullo G, Dogliotti E. 8-Oxoguanine DNA-glycosylase repair activity and expression: a comparison between cryopreserved isolated lymphocytes and EBV-derived lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res* 2011;718(1-2):62-7.
12. Curtin K, Samowitz WS, Wolff RK, Ulrich CM, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML. Assessing tumor mutations to gain insight into base excision repair sequence polymorphisms and smoking in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(12):3384-8.
13. Nemecek AA, Wallace SS, Sweasy JB. Variant base excision repair proteins: contributors to genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2010;20(5):320-8.
14. Simonelli V, D'Errico M, Palli D, Prasad R, Wilson SH, Dogliotti E. Characterization of DNA polymerase beta splicing variants in gastric cancer: the most frequent exon 2-deleted isoform is a non-coding RNA. *Mutat Res* 2009;670(1-2):79-87.
15. D'Errico M, de Rinaldis E, Blasi MF, Viti V, Falchetti M, Calcagnile A, Sera F, Saieva C, Ottini L, Palli D, Palombo F, Giuliani A, Dogliotti E. Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2009;45(3):461-9.
16. Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterology* 2007;(6):1858-68.
17. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010;46(15):2788-98.
18. Carden CP, Yap TA, Kaye SB. PARP inhibition: *targeting* the Achilles' heel of DNA repair to treat germline and sporadic ovarian cancers. *Curr Opin Oncol* 2010;22(5):473-80.
19. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V, Samson LD, Harris CC. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest* 2003;112(12):1887-94.